



Localisation d'inclusions fluorescentes dans les milieux diffusants à l'aide de techniques laser. Application au diagnostic médical in vivo

Jérôme Boutet

► To cite this version:

Jérôme Boutet. Localisation d'inclusions fluorescentes dans les milieux diffusants à l'aide de techniques laser. Application au diagnostic médical in vivo. Autre [cond-mat.other]. Université de Grenoble, 2012. Français. NNT : 2012GRENY009 . tel-00767333

HAL Id: tel-00767333

<https://theses.hal.science/tel-00767333>

Submitted on 19 Dec 2012

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

THÈSE

Pour obtenir le grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ DE GRENOBLE

Spécialité : **Physique des Sciences du Vivant**

Arrêté ministériel du 7 Août 2006

Présentée par

Jérôme Boutet

Thèse dirigée par **Jacques Derouard**

préparée au sein du **Laboratoire Imagerie et Systèmes d'Acquisition au CEA-LETI**
et de l'**Ecole Doctorale de Physique de Grenoble**

Localisation d'inclusions fluorescentes dans les milieux diffusants à l'aide de techniques laser.

Application au diagnostic médical in vivo.

Thèse soutenue publiquement le **4 avril 2012**,
devant le jury composé de :

M. Eric Lacot

Professeur, Université de Grenoble, Président

M. Patrick Poulet

Me. de Conférences-Praticien Hospitalier, Université de Strasbourg, Rapporteur

M. Jean-Michel Tualle

Chargé de recherche, Université Paris 13, Rapporteur

Mme Geneviève Bourg-Heckly

Me. de Conférences, Université Pierre et Marie Curie, Examinatrice

M. Nicolas Grenier

Professeur, Université Bordeaux 2, Examineur

M. Jacques Derouard

Professeur, Université de Grenoble, Directeur de thèse

M. Jean-Marc Dinten

Chef de Laboratoire, CEA-LETI Grenoble, Encadrant

M. Philippe Peltié

Docteur, Invité



Remerciements

Ce travail de thèse a été effectué au Laboratoire d’Imagerie et Systèmes d’acquisitions du Département Technologies. Je remercie Jean-Marc Dinten d’avoir accepté que je réalise ma thèse en parallèle de mes activités de chef de projet et d’avoir participé activement à son encadrement.

Je tiens à exprimer ma gratitude à Jacques Derouard qui a dirigé cette thèse de façon très impliquée et a su à plusieurs reprises la réorienter dans le bon sens. Je remercie également Philippe Peltié pour ses conseils techniques avisés, son implication importante dans la relecture du mémoire, sa constance et son soutien moral.

Je tiens à remercier Patrick Poulet et Jean-Michel Tualle pour avoir accepté d’être rapporteurs de ce travail. Je remercie également les autres membres du jury, Nicolas Grenier, Geneviève Bourg-Heckly, Éric Lacot.

Mes remerciements sincères vont également à l’équipe ayant participé au développement du tomographe préclinique notamment Anne Kœnig, Michel Berger, Georges Gonon Cédric Allier, et Véronique Josserand. Je remercie également l’équipe du LISA qui a travaillé sur l’instrumentation résolue en temps, Mathieu Debourdeau, Lionel Hervé, Aurélie Laidevant, Ludovic Lecordier mais aussi les partenaires extérieurs, notamment Didier Vray et François Dubœuf, de l’INSA CREATIS, Patrick Georges, de l’Institut d’Optique, An Nguyen Dinh et Odile Messineo de la société VERMON SA, et Antoine Courjaud, d’AMPLITUDE SYSTEMES. Je remercie également Philippe Rizo pour sa contribution au début de la thèse et Jean Hue pour son aide concernant la tenue au flux laser des tissus biologiques.

Merci enfin, à ceux qui m’ont soutenu aussi en dehors du travail. Je tiens à remercier mes parents qui m’ont toujours poussé à dépasser mes limites et m’ont transmis le goût de l’effort intellectuel. Je remercie également ma sœur pour la compétition amicale que nous menons depuis quelques années. Enfin, je remercie tout particulièrement Mélanie pour son soutien indéfectible, son implication de tous les instants et son courage, durant ces années et au cours des événements personnels heureux et douloureux que nous avons vécus. Enfin, je remercie ma fille Livia de m’avoir communiqué sa joie de vivre et sa bonne humeur depuis sa naissance.

Je remercie également Jean-Luc Achard pour m’avoir aidé à y voir beaucoup plus clair dans de nombreux domaines.

Pour résumer et n’oublier personne, que tous ceux qui m’ont soutenu pendant ces années trouvent ici l’expression de ma reconnaissance et de mon amitié.

Table des matières

Introduction	1
I La tomographie optique de fluorescence in vivo	4
1 Interaction de la lumière avec les tissus vivants	5
1.1 L'absorption	5
1.1.1 Le coefficient d'absorption	5
1.1.2 Principaux absorbeurs présents dans les tissus	6
1.1.3 La notion de fenêtre thérapeutique	8
1.2 La diffusion	8
1.2.1 Le coefficient de diffusion	8
1.2.2 L'anisotropie de diffusion	9
1.2.3 Le coefficient de diffusion réduit	10
1.3 La fluorescence	10
2 L'équation de la diffusion	13
2.1 L'équation de transfert radiatif	13
2.1.1 Grandeurs utilisées pour décrire la propagation de la lumière . .	13
2.1.2 Hypothèse P_1	14
2.1.3 L'Équation de Transfert Radiatif (ETR)	14
2.2 L'équation de la diffusion (ED)	15
2.3 Solutions de l'équation de la diffusion	16
2.3.1 Solutions analytiques de l'ED en milieu infini et homogène : fonc- tions de Green	16
2.3.1.1 Solution dynamique (cas des mesures résolues en temps)	16
2.3.1.2 Solution statique (cas de la mesure en continu)	16
2.3.1.3 Interprétation physique de la fonction de Green	17
2.3.2 Solutions analytiques en milieu semi-infini : conditions aux limites	17
2.3.3 Solutions numériques	18
2.3.4 Domaine de validité de l'équation de la diffusion	18
3 Méthodes d'imagerie optique in vivo	19
3.1 Des outils adaptés aux différentes échelles d'observation	19
3.2 Méthodes optiques permettant de réaliser des mesures en profondeur .	20

3.3	Méthodes tomographiques basées sur la mesure des propriétés optiques endogènes des tissus	22
3.3.1	Méthodes continues	22
3.3.2	Méthodes résolues en temps	22
3.3.3	Méthodes fréquentielles	23
3.3.4	Positionnement des méthodes endogènes par rapport à celles basées sur un marquage fluorescent	23
3.4	Systèmes basés sur le marquage fluorescent ou bioluminescent	24
3.4.1	Les marqueurs fluorescents	24
3.4.1.1	Marqueurs exogènes	24
3.4.1.2	Marqueurs endogènes	26
3.4.2	Règles fixées par la législation européenne concernant l'injection de marqueurs	26
3.4.2.1	Études précliniques	26
3.4.2.2	Études cliniques	27
3.4.3	État actuel des connaissances quant à la toxicité des marqueurs fluorescents	28
3.4.4	Méthodes optiques de localisation des marqueurs	28
3.4.4.1	Imagerie de Fluorescence par Réflexion	28
3.4.4.2	Tomographie de Fluorescence Diffuse (FDOT)	30
3.4.4.3	Tomographie de fluorescence résolue en temps	31
3.5	Position actuelle de la tomographie optique par rapport aux techniques traditionnelles de l'imagerie clinique	32
3.5.1	Positionnement par rapport à l'IRM	32
3.5.2	Positionnement par rapport au SPECT	32
3.5.3	Positionnement par rapport au PET	33
3.5.4	Positionnement par rapport à l'échographie	33
3.5.5	Positionnement par rapport à l'optoacoustique	34

II Un tomographe de fluorescence continu optimisé pour l'observation des tissus de faible épaisseur 35

1	Quelles longueurs d'onde de travail permettent de minimiser les effets de l'absorption des tissus ? 38
1.1	Les plages de longueur d'onde proposées par les systèmes existants . . . 38
1.2	Le fluorophore et la source de lumière optimaux pour la mesure dans les organes les plus absorbants de l'animal 39
1.2.1	Évaluation expérimentale de la « fenêtre thérapeutique » de la souris 39
1.2.2	Quelle est la longueur d'onde laser optimale ? 40
1.2.3	Quels sont les fluorophores optimaux ? 41
1.3	Un dispositif de filtrage optimisé 43
1.3.1	Deux critères pour déterminer la combinaison de filtres optimale 43

1.3.2	Optimisation du spectre de la lumière d'excitation pour améliorer l'efficacité globale du filtrage	44
2	Les performances de détection requises pour l'observation dans des tissus très absorbants	47
2.1	La sensibilité et la dynamique des systèmes existants	47
2.2	L'analyse de signaux biologiques réels	48
2.2.1	Protocole de mesure et dispositif expérimental	48
2.2.2	Niveau de signal et dynamique d'une acquisition typique dans la cage thoracique	49
2.2.3	Sensibilité et dynamique du système sur la plage de signal d'intérêt	50
3	Quels moyens instrumentaux pour faire face à l'hétérogénéité des tissus ?	54
3.1	Évaluation de la transmission relative des différents organes d'un animal	54
3.2	Méthodes couramment employées pour calculer le temps d'exposition optimal	55
3.2.1	Méthode de calcul itérative du temps d'exposition optimal . . .	56
3.2.2	Efficacité de la méthode du calcul du temps d'exposition optimal sur un cas biologique	57
4	Évaluation des performances du système associé à une méthode de reconstruction	60
4.1	Une méthode de reconstruction contribuant à la prise en compte des hétérogénéités d'absorption	60
4.2	Évaluation de la résolution du tomographe	61
4.2.1	Résolution des systèmes existants	61
4.2.2	Évaluation de la résolution dans le plan X,Y dans un fantôme hétérogène	61
4.2.3	Évaluation de la résolution suivant l'axe Z	63
4.2.4	Évaluation de la capacité du système à quantifier une concentration donnée de fluorophore in-vivo (concentration détectable et linéarité)	64
4.2.4.1	Linéarité	64
4.2.4.2	Concentration minimum détectable (sensibilité)	65
4.3	Validation biologique de la capacité du système et de la méthode à localiser et à quantifier des tumeurs marquées dans les poumons	66
4.3.1	Protocole biologique	66
4.3.2	Résultats	66
4.4	Bilan des chapitres 1, 2, 3 et 4	69
5	Ce tomographe continu peut-il être appliqué à l'observation de tissus plus épais ?	71
5.1	Systèmes ayant permis de détecter une accumulation d'ICG dans des tumeurs mammaires	71

5.2	Problématique	73
5.3	Adaptation de la géométrie d'acquisition aux tissus plus épais	74
5.3.1	Résolution obtenue sans optimisation de la géométrie d'acquisition	74
5.3.2	Disque d'excitation et de détection optimaux	75
5.3.2.1	Définitions	75
5.3.2.2	Disque d'excitation optimal	75
5.3.2.3	Disque de détection optimal	76
5.3.3	Influence de la concentration du fluorophore sur les paramètres géométriques optimaux	77
5.4	Résolution obtenue sur des tissus épais à l'aide d'une méthode de reconstruction en continu	78
5.5	Bilan de la deuxième partie	81

III Optimisation d'un tomographe de fluorescence résolu en temps pour l'observation des tissus épais 83

1	Apport de la mesure résolue en temps pour la localisation d'une inclusion fluorescente	86
1.1	Principe de la mesure par temps de vol moyen	86
1.2	Relation entre les temps de vol et la distance parcourue dans le milieu .	88
1.2.1	Moments d'ordre 0 et 1 du flux d'énergie diffus	88
1.2.2	Équation temps de vol - distance	89
1.3	Méthode de localisation par mesure de l'intensité et du temps de vol moyen	89
1.4	Exemple d'amélioration de la résolution temporelle par les temps de vol en géométrie de réflexion	91
1.5	Systèmes optiques capables de mesurer l'intensité et le temps de vol moyen	92
1.5.1	Systèmes basés sur un mono-détecteur et une carte de comptage TCSPC	92
1.5.2	Systèmes basés sur une caméra rapide intensifiée (HRI)	94
1.5.3	Caméras à balayage de fente	96
1.6	Problématique : quel système pour localiser avec précision et en profondeur une inclusion fluorescente ?	96
2	Comparaison de la sensibilité d'un HRI et d'une chaîne TCSPC	98
2.1	Évaluation de la sensibilité de la chaîne de comptage TCSPC	98
2.1.1	Chaîne TCSPC utilisée pour la comparaison	98
2.1.2	Rendement quantique	99
2.1.3	Défectivité	99
2.2	Évaluation de la sensibilité du HRI	100
2.2.1	Banc HRI utilisé pour la comparaison	100
2.2.2	Rendement quantique du HRI	100
2.2.3	Proportion de photons non comptabilisés par le fenêtrage temporel	101
2.2.4	Défectivité du HRI	105
2.3	Bilan comparatif de la sensibilité des deux systèmes	107

3	Comparaison de la précision de mesure du temps de vol moyen déterminé par un HRI et par une chaîne TCSPC	108
3.1	Distinction entre la résolution temporelle du système et l'incertitude sur la mesure des temps de vol moyens	108
3.2	Incertitude de mesure des temps de vols par chaîne de comptage TCSPC	108
3.3	Application au cas concret du photomultiplicateur H5773	111
3.3.1	Généralisation : notion de profondeur limite	113
3.4	Influence du courant et du bruit d'obscurité du détecteur sur la mesure du temps de vol	114
3.5	Incertitude liée à la présence du « jitter » de la chaîne TCSPC	115
3.6	Bilan des sources d'incertitude sur du temps de vol moyen mesuré par une chaîne TCSPC	115
3.7	Stabilité des mesures d'intensité et de temps de vol par TCSPC	116
3.8	Analyse de l'incertitude sur les temps de vols dans le cas d'un système de fenêtrage temporel (HRI)	119
3.8.1	Mesure de l'IRF de la caméra rapide intensifiée	119
3.8.1.1	Conséquence sur l'incertitude des temps de vols	120
3.8.2	Bilan de l'incertitude sur la mesure du temps de vol moyen par un HRI	121
3.8.3	Stabilité des mesures d'intensité et de temps de vol par HRI	122
3.8.4	Bilan comparatif de l'incertitude sur la mesure des temps de vol par HRI et TCSPC	122
3.9	Type de détecteur optimal selon l'application visée	124
3.9.1	Un HRI pour une mesure sur de faibles épaisseurs (<1 cm) ou dans des tissus faiblement absorbants	124
3.9.2	Une chaîne TCSPC pour localiser des inclusions plus profondes dans des tissus d'absorption élevée	125
4	Comment utiliser de façon optimale une chaîne TCSPC et un HRI pour mesurer les temps de vol moyens	127
4.1	Dimension optimale des canaux temporels de la chaîne TCSPC	127
4.1.1	Approche par la théorie des histogrammes	128
4.1.2	Approche par la théorie de la quantification	128
4.1.3	Pas de quantification temporel optimal : généralisation	131
4.2	Optimisation du paramétrage d'un système de fenêtrage temporel	132
4.2.1	Pas de balayage optimal	133
4.2.2	Largeur optimale de la fenêtre temporelle d'un HRI	133
4.3	Bilan des chapitres 1, 2, 3 et 4	135
5	Perspectives : application de la tomographie de fluorescence résolue en temps au diagnostic du cancer de la prostate	136
5.1	Problématique	136
5.2	Dispositif expérimental	137
5.3	Résultats	139
5.3.1	Evaluation préclinique	140

5.4 Conclusion du chapitre 5	141
Conclusion générale	143
Annexes	146
Bilan des publications et brevets réalisés durant la thèse	163
Bibliographie	168

Introduction

L'imagerie optique diffuse de fluorescence est une technique utilisée de plus en plus fréquemment par l'industrie pharmaceutique dans le cadre d'études précliniques¹ et bientôt dans le domaine clinique. Elle permet de localiser, d'identifier et de quantifier des cellules marquées au sein des tissus vivants. Le principe consiste à injecter au sujet (patient ou petit animal) des marqueurs fluorescents qui se fixent sur des tissus cibles comme par exemple des tumeurs cancéreuses. Comparée à des modalités d'imagerie traditionnelles, l'imagerie optique de fluorescence présente l'avantage de ne pas utiliser de rayonnement ionisant. Par rapport aux techniques plus récentes d'imagerie optique basées sur les mesures d'absorption des tissus dans le proche infrarouge, la fluorescence apporte un meilleur contraste, et la possibilité d'observer des phénomènes moléculaires comme la biodistribution d'un médicament par exemple.

Le développement de techniques optiques permettant de localiser les marqueurs fluorescents in vivo a connu un essor considérable durant les dix dernières années. Le principe consiste à utiliser une source de lumière qui peut pénétrer à travers les tissus et exciter les fluorophores. La fluorescence émise est détectée à la sortie des tissus par un dispositif photosensible (photo-détecteur ou dispositif d'imagerie). Étant donné que la fenêtre de moindre absorption des tissus est située dans le proche infrarouge, la source de lumière et les fluorophores sont généralement choisis dans ce domaine dès lors qu'on veut détecter des phénomènes en profondeur.

Le Laboratoire d'Imagerie et de Systèmes d'Acquisition (LISA) du CEA avait déjà développé un savoir-faire dans la réalisation de systèmes d'imagerie de fluorescence. Il disposait également d'un réservoir de connaissances en méthodologie de reconstruction et d'inversion dans le domaine des rayons X. Aussi a-t-il été décidé, en 2003, de tirer parti de ces deux domaines d'expertise en lançant dans ce laboratoire un nouveau thème portant sur la fluorescence in vivo.

Pour résoudre le problème de la détection en profondeur, le laboratoire a orienté son développement vers les techniques de tomographie optique de fluorescence. Le principe consiste à combiner un balayage spatial de la source de lumière avec une mesure de fluorescence en plusieurs points répartis sur la surface de l'animal. À l'aide d'un modèle de propagation de la lumière dans les tissus diffusants, il est alors possible de reconstruire la carte de fluorescence en 3D.

La première partie de ce mémoire exposera les bases théoriques sur lesquelles repose la tomographie optique. Pour cela, elle décrira les propriétés optiques des tissus vivants

1. préclinique = sur petit animal

et la théorie de la propagation de la lumière dans ces milieux absorbants et diffusants : en effet, de nombreux choix expérimentaux et méthodologiques reposent sur ces propriétés. Cette première partie propose également un état de l'art des différentes techniques de tomographie optique in vivo - avec ou sans marquage fluorescent - ainsi que leur positionnement par rapport aux techniques d'imagerie conventionnelles (échographie, scanner, IRM...).

Après avoir développé une première maquette de tomographe optique inspirée de systèmes existants, nous nous sommes rendu compte que les performances de détection dans les organes de l'animal absorbant fortement la lumière (poumons, foie) n'étaient pas suffisantes. Les publications mettant en œuvre des systèmes de tomographie de fluorescence portaient sur des tumeurs sous-cutanées, ou situées dans l'abdomen, mais aucune sur le foie ou les poumons de l'animal. Or la détection dans ces organes est essentielle : en raison de leur vascularisation importante, c'est là que se forment des métastases dans le cas d'un cancer. Par exemple, si l'on injecte des cellules tumorales à une souris immunodéprimée, c'est en priorité dans le foie et les poumons que se fixeront et se développeront les métastases. Or, pour suivre, par exemple, la biodistribution d'un médicament, il est indispensable d'obtenir la cartographie de fluorescence complète du corps de l'animal, ce que ne permettaient pas les systèmes existants.

Dans la deuxième partie, nous déterminerons les conditions expérimentales optimales pour la détection dans ces organes très absorbants. En premier lieu, nous décrirons nos choix techniques : la source de lumière optimale, le mode de filtrage et la sensibilité de détection requise. Pour faire face à l'hétérogénéité des tissus, nous adopterons une méthode d'adaptation automatique des temps d'exposition au niveau du signal mesuré. Puis, nous évaluerons la capacité de l'appareil à localiser des inclusions dans des tissus épais et absorbants à l'aide d'un fantôme présentant des zones absorbantes. Nous quantifierons également la résolution et la linéarité du dispositif afin de vérifier que les caractéristiques du système satisfont aux exigences de la mesure in vivo sur petit animal. Enfin, nous mettrons en œuvre le tomographe ainsi optimisé sur un cas préclinique concret en suivant l'évolution de tumeurs pulmonaires.

Dans une deuxième étape, nous évaluerons si le tomographe continu optimisé peut être appliqué à l'observation de tissus plus épais, comme les organes humains (typiquement 4 à 8 cm). Après une étude de faisabilité présentée à la fin de la deuxième partie, nous montrerons que l'approche continue permet bien de détecter des inclusions fluorescentes, mais que la résolution obtenue est insuffisante pour convaincre les praticiens d'adopter cette technique.

La troisième partie portera sur le design et l'optimisation d'une chaîne de mesure résolue en temps pour l'observation des tissus épais. Nous rappellerons brièvement le principe d'une mesure résolue en temps et montrerons son apport sur la précision de localisation d'une inclusion fluorescente avec un exemple concret. Puis, nous établirons un état de l'art des systèmes de mesure de fluorescence résolus en temps qui mettra notamment en évidence les deux grandes familles de systèmes employés : les caméras rapides intensifiées (HRI) et les chaînes de comptage de photons résolues en temps (TCSPC).

Le premier point consistera à déterminer quel est le dispositif expérimental donnant la meilleure précision de mesure du temps de vol moyen. Nous établirons notamment que cette précision dépend de la résolution temporelle du détecteur, *mais aussi et surtout du nombre de photons collectés*, ce qui nous amènera également à comparer la sensibilité des deux systèmes. Cette étude s'appuiera d'une part sur des mesures expérimentales réalisées sur deux chaînes (HRI et TCSPC), et d'autre part sur des simulations basées sur le modèle des fonctions de Green en milieu homogène et infini. Nous proposerons également une modélisation mathématique originale de certains paramètres expérimentaux, comme par exemple la part de photons comptabilisés par un système de fenêtrage temporel. Au vu de ces résultats, nous comparerons les performances respectives des deux chaînes pour la mesure du temps de vol moyen et déterminerons le système le plus adapté en fonction des caractéristiques du milieu diffus et de la profondeur des objets que l'on souhaite localiser.

En second lieu, à l'aide des modèles développés, nous proposerons une méthodologie permettant d'optimiser les paramètres expérimentaux des deux chaînes de mesure pour obtenir une mesure des temps de vol aussi précise que possible.

Enfin, nous montrerons comment ces résultats peuvent être mis en pratique pour réaliser un instrument optimal répondant à une problématique clinique concrète : le guidage de biopsies dans le cadre du diagnostic du cancer de la prostate.

Première partie

La tomographie optique de fluorescence in vivo

Chapitre 1

Interaction de la lumière avec les tissus vivants

Nous allons introduire les concepts physiques qui permettent de modéliser la propagation de la lumière dans les tissus vivants. Ces notions interviennent directement dans les algorithmes de reconstruction utilisés pour remonter à la carte de fluorescence des tissus. Elles sont également indispensables au dimensionnement et à l'optimisation des tomographes continus et résolus en temps présentés respectivement dans les deuxième et troisième parties.

Les trois principales propriétés optiques des tissus sont l'absorption, la diffusion et la fluorescence.

- L'absorption correspond à notre perception de la couleur du tissu : en effet, les différentes longueurs d'ondes du spectre visibles ne sont pas absorbées avec la même intensité, ce qui induit une modification du spectre de la lumière qui parvient à nos yeux.
- La diffusion est la première caractéristique immédiatement observable : l'image que l'on a d'un tissu provient de la lumière qui est diffusée à la surface de celui-ci.
- La fluorescence intervient lorsqu'on éclaire un tissu à une longueur d'onde donnée et que celui-ci émet une lumière moins intense et décalée spectralement vers le proche-infrarouge (loi de Stokes).

1.1 L'absorption

1.1.1 Le coefficient d'absorption

D'un point de vue microscopique, l'absorption a lieu lorsqu'un photon interagit avec un électron, plaçant celui-ci dans un état d'énergie supérieure. La desexcitation peut avoir lieu de diverses manières, la plus courante étant la dissipation de chaleur.

De manière quantitative, l'absorption d'un faisceau de lumière d'intensité I_0 par un milieu homogène, isotrope et non-diffusant est décrite par la relation de Beer-Lambert. Pour un faisceau lumineux monochromatique, on a :

$$I(x) = I_0 \exp(-\mu_a(\lambda) x) \quad (1.1)$$

avec μ_a le *coefficient d'absorption* [cm^{-1}] du milieu à la longueur d'onde λ et x la distance traversée par la lumière [cm].

Dans le cas d'un milieu composé de différents centres absorbeurs, la loi précédente reste valable en écrivant $\mu_a = \sum \rho_i \sigma_{ai}$ avec σ_{ai} la section efficace d'absorption du diffuseur i et ρ_i sa densité dans le milieu.

L'inverse de μ_a correspond à la distance moyenne parcourue par un photon avant d'être absorbé. Il s'agit du libre parcours moyen d'absorption que l'on note :

$$l_a = \frac{1}{\mu_a} \quad (1.2)$$

1.1.2 Principaux absorbeurs présents dans les tissus

Parmi les différents constituants des tissus des vertébrés, c'est l'*hémoglobine* qui contribue le plus à l'absorption de la lumière dans le rouge et le proche infrarouge. Celle-ci, essentiellement présente dans les hématies, achemine l'oxygène des poumons jusqu'aux muscles et aux organes. Elle peut se présenter sous deux formes, l'oxyhémoglobine HbO_2 et la desoxyhémoglobine Hb qui ont des spectres d'absorption différents. La figure 1.1 montre l'influence de la longueur d'onde sur leur coefficient d'absorption molaire.

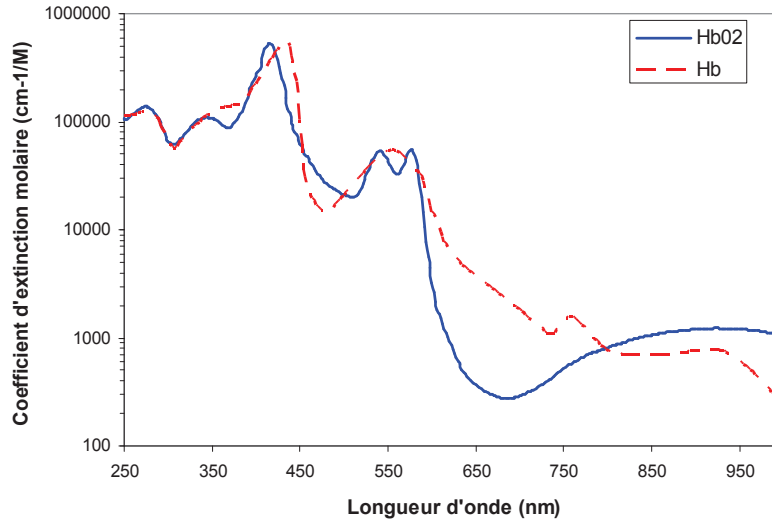


FIGURE 1.1 – Coefficient d'extinction molaire de l'hémoglobine oxygénée et désoxygénée en fonction de la longueur d'onde [1].

Le sang contenu dans les tissus est généralement constitué d'un mélange de Hb et HbO_2 . Le coefficient d'absorption du sang au point \vec{r} peut être déduit de la relation suivante :

$$\mu_a(\lambda, \vec{r}) = 2,303 \times (\alpha_{Hb}(\lambda) [Hb](\vec{r}) + \alpha_{HbO_2}(\lambda) [HbO_2](\vec{r})) \quad (1.3)$$

avec λ la longueur d'onde, α_{Hb} et α_{HbO_2} les coefficients d'extinction molaire des deux types d'hémoglobine ($cm^{-1}M^{-1}$), $[Hb]$ et $[HbO_2]$ leurs concentrations respectives (mol/L).

Bien que la concentration totale en hémoglobine $[Hb] + [HbO_2]$ soit relativement constante dans le sang adulte (valeur typique $2,33 \times 10^{-3} mol.L^{-1}$), le coefficient d'absorption dans le sang dépend de la longueur d'onde mais aussi des concentrations relatives de Hb et HbO_2 . On définit ainsi la saturation en oxygène de l'hémoglobine SO_2 , donnée par :

$$SO_2 = \frac{[HbO_2]}{[Hb] + [HbO_2]} \quad (1.4)$$

qui décrit la concentration relative des deux types d'hémoglobine. Par exemple, le sang des artères et celui des veines n'ont pas le même coefficient d'absorption en raison de leur différence de SO_2 .

On constate un comportement en longueur d'onde semblable entre 250 et 600 nm, puis, au delà de 600 nm, une forte différenciation. On remarque l'existence d'un point isobestique, longueur d'onde pour laquelle les courbes des coefficients d'absorption se croisent, à 800 nm.

Le second absorbeur présent dans les tissus est l'eau, qui constitue 80% de notre organisme. L'eau présente une bonne transmission dans le visible, mais celle-ci diminue rapidement dès que l'on se rapproche du domaine infrarouge. Parmi les autres composants des tissus susceptibles d'avoir une influence sur le coefficient d'absorption on peut citer la mélanine, qui joue un rôle dans le coefficient d'absorption de la peau. Celui-ci a été caractérisée par S.L. Jacques et al. (voir la référence [2]). La figure 1.2 montre la contribution de l'eau, du sang et de la mélanine dans le coefficient d'absorption moyen d'un tissu humain.

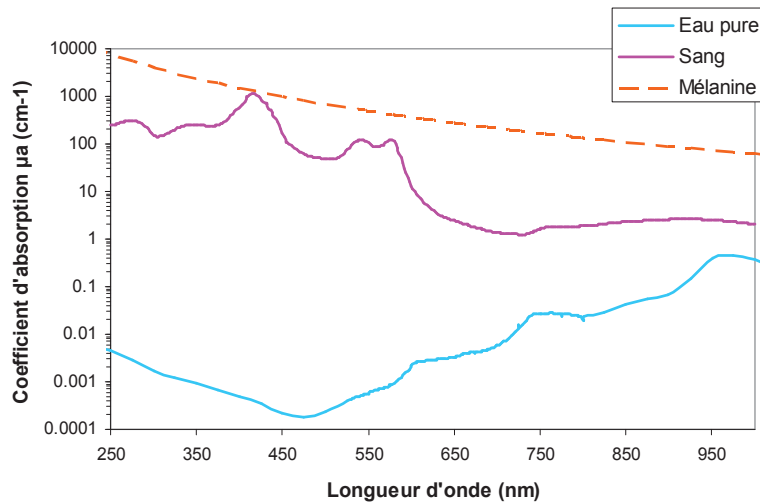


FIGURE 1.2 – Coefficient d'absorption de l'eau, du sang (pour une valeur de $SO_2 = 80\%$ et une concentration d'hémoglobine totale de $2,33 \times 10^{-3} mol/L$, et de la mélanine (tendance) [2].

Les lipides sont également présents dans la plupart des régions de l'organisme. Leur absorption, caractérisée par Veen et al. [3] est du même ordre de grandeur que l'eau dans le proche infrarouge : $3 \cdot 10^{-3} \text{ cm}^{-1}$ à 700 nm.

On peut également citer le cytochrome c oxydase qui joue un rôle dans le cycle respiratoire de la cellule. Son coefficient d'absorption $0,5 \text{ cm}^{-1}$ à 700 nm est semblable à celui de l'hémoglobine mais sa concentration dans les tissus est plus faible d'un ordre de grandeur [4].

1.1.3 La notion de fenêtre thérapeutique

Si l'on observe les valeurs d'absorption de l'eau et de l'hémoglobine en fonction de la longueur d'onde, on constate que le minimum est atteint entre 650 et 800 nm. Cet intervalle, appelé « *fenêtre thérapeutique* » ou « *fenêtre optique* », est donc le plus adapté aux mesures en profondeur dans les tissus vivants. C'est une notion importante car elle va orienter la plupart des choix instrumentaux (longueur d'onde des sources de lumière, rendement quantique des détecteurs) et des marqueurs fluorescents utilisés.

L'absorption constitue donc la première caractéristique optique des tissus vivants. La seconde, toute aussi essentielle, est la diffusion.

1.2 La diffusion

Dans les tissus vivants, la lumière ne se déplace pas en ligne droite : c'est à l'intérieur des cellules, au niveau des sous-unités, *les organelles*, qu'ont lieu des diffusions [5]. Les organelles sont séparées du reste de la cellule par des membranes lipidiques. De légères variations de salinité et de concentration de constituants entre les différentes organelles expliquent ces phénomènes de diffusion en chaîne.

Le type de régime de diffusion de la lumière dépend de la taille des centres diffusant par rapport à la longueur d'onde. Dans le cas des organelles dont la taille est évaluée autour de 1 μm , proche ou légèrement supérieure aux longueurs d'onde de la fenêtre thérapeutique, c'est le régime de diffusion de Mie qui s'applique.

Dans ce régime, la répartition spatiale de la lumière diffusée n'est plus isotrope et dépend fortement de la forme des diffuseurs et de leur taille. Plus le diamètre d'un diffuseur sphérique augmente, plus la lumière est diffusée vers l'avant. Le diagramme de diffusion prend la forme d'un lobe ovoïde et certaines directions sont alors privilégiées. Enfin, l'intensité de la lumière diffusée augmente avec la différence entre l'indice de réfraction du centre diffuseur et celui du milieu d'accueil.

1.2.1 Le coefficient de diffusion

Par analogie avec l'absorption, on définit un *coefficient de diffusion* de telle sorte que si l'on suppose un milieu homogène et non absorbant, la partie non diffusée $I(x)$ de l'intensité lumineuse peut s'exprimer :

$$I(x) = I_0 \exp(-\mu_s(\lambda)x) \quad (1.5)$$

avec μ_s le *coefficient de diffusion* [cm^{-1}] du milieu à la longueur d'onde λ et x la distance traversée par la lumière [cm].

On définit également l_s , le libre parcours moyen, qui représente la distance moyenne parcourue par un photon avant d'être diffusé. Il est donné par :

$$l_s = \frac{1}{\mu_s} \quad (1.6)$$

1.2.2 L'anisotropie de diffusion

Dans les tissus biologiques, les photons ne sont pas diffusés de manière isotrope par les centres diffuseurs. Dans le régime de Mie, lors d'une collision, un photon a une plus grande probabilité d'être diffusé dans la direction incidente qu'à angle droit, ou vers l'arrière.

Le modèle empirique le plus couramment utilisé pour décrire la probabilité pour un photon d'être diffusé suivant un angle θ est donné par la fonction de Henyey Greenstein $H(\theta)$ où $g \in [0, 1[$:

$$H(\theta) = \frac{1}{2} \left[\frac{1 - g}{1 - 2g \cos \theta + g^2} \right] \quad (1.7)$$

avec g désignant le facteur d'anisotropie et correspondant au cosinus de l'angle de diffusion moyen.

Cette fonction permet, en faisant varier le paramètre g , de décrire un grand nombre de diffusions possibles, plus ou moins anisotropes comme le montrent les figures 1.3 et 1.4.

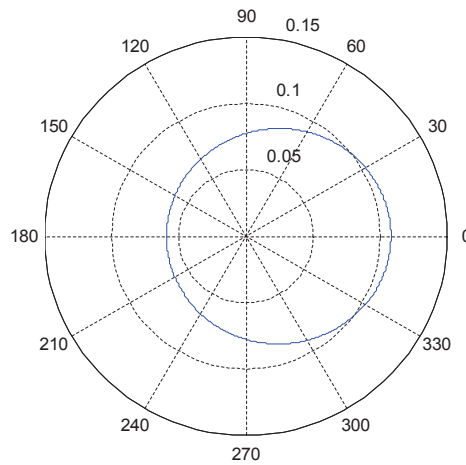


FIGURE 1.3 – Distribution angulaire $H(\theta)$ avec $g=0,1$ (faible anisotropie).

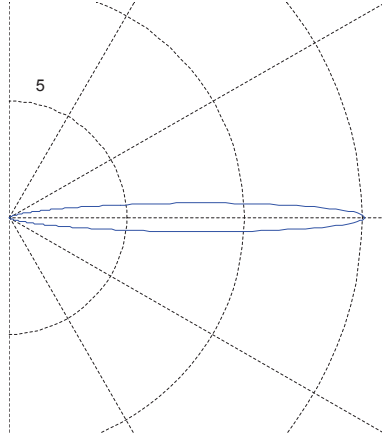


FIGURE 1.4 – Distribution angulaire $H(\theta)$ avec $g=0.9$ (forte anisotropie).

1.2.3 Le coefficient de diffusion réduit

Dans le cas des tissus biologiques, le coefficient g est estimé typiquement à 0,90 et peut varier entre 0,70 et 0,99. On est donc dans le cas d'une diffusion très directive, orientée vers l'avant.

Cependant, si l'on observe un volume de tissu suffisamment grand, la lumière va diffuser de plus en plus de telle sorte qu'on pourra considérer une diffusion isotrope à la sortie du volume. On définit ainsi le coefficient de diffusion réduit μ'_s par la relation :

$$\mu'_s = (1 - g) \mu_s \quad (1.8)$$

Ce qui donne donc dans le cas des tissus biologiques : $\mu'_s \approx \mu_s/10$. Le coefficient de diffusion réduit μ'_s correspond à un coefficient de diffusion isotrope équivalent. C'est lui qui sera utilisé dans l'approximation de la diffusion. On définit également le chemin parcouru par un faisceau collimaté avant qu'il devienne isotrope :

$$l'_s = \frac{1}{\mu'_s} \quad (1.9)$$

C'est aussi la distance au bout de laquelle le photon a perdu la mémoire de sa direction initiale. Cette distance vaut environ 1 mm dans le cas de tissus biologiques ($\mu'_s \approx 10 \text{ cm}^{-1}$) dans le proche IR.

1.3 La fluorescence

La fluorescence est une propriété très souvent exploitée dans les techniques d'imagerie in-vivo. Nous la décrivons parmi les propriétés des tissus, car ceux-ci contiennent naturellement des substances ayant la propriété de fluorescer. Dans la gamme de longueur d'onde de la fenêtre physiologique, il s'agit principalement des protoporphyrines.

La fluorescence se produit lorsqu'une molécule (le fluorophore) absorbe de la lumière, causant une excitation électronique. La relaxation de l'excitation qui s'ensuit produit une émission de lumière, celle-ci étant émise à des longueurs d'onde plus longues que la longueur d'onde absorbée (décalage de Stokes). Le phénomène de fluorescence est généralement illustré par le diagramme de Jablonski représenté sur la figure 1.5.

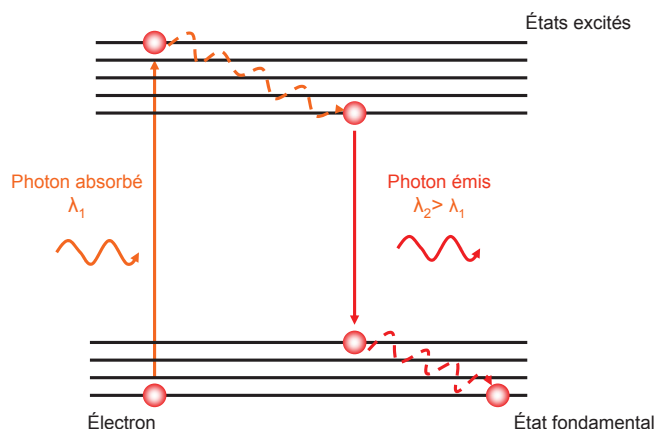


FIGURE 1.5 – Étapes menant au phénomène de fluorescence

Après absorption d'un photon, plusieurs phénomènes s'enchaînent. Tout d'abord, la molécule redescend au plus bas des niveaux énergétiques vibrationnels de l'état considéré. Ce phénomène est appelé conversion interne (IC) et se produit très rapidement, en moins de 10^{-12} s. Ensuite, la molécule retourne à l'état fondamental en émettant un photon. Généralement, cette transition se fait vers des niveaux vibrationnels excités correspondant à une même dimension d'orbitale. Cependant, elle peut également se faire vers un niveau inférieur, produisant alors un photon d'énergie plus élevée. Cette plage d'énergie possible explique la largeur des spectres d'absorption et d'émission des fluorophores, dont un exemple est représenté sur la figure 1.6. La durée moyenne avant l'émission d'un photon de fluorescence est typiquement de 10^{-9} s. Cette durée de vie, caractéristique du fluorophore utilisé entrera en jeu dans les phénomènes mesurés dans la troisième partie. Enfin, dernière étape, la molécule retourne à l'équilibre thermique par le même processus de conversion interne que précédemment.

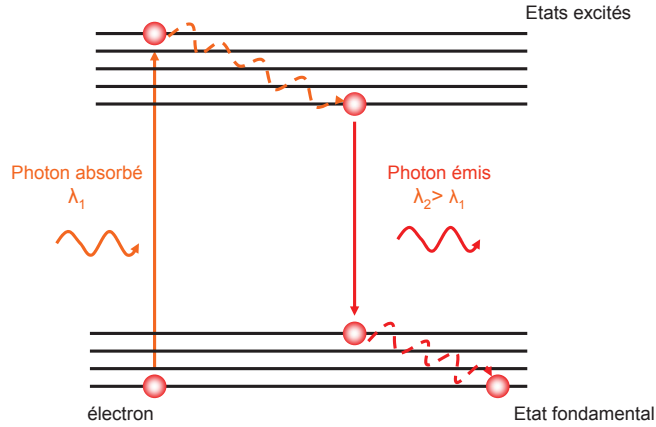


FIGURE 1.6 – Illustration du diagramme de Jablonsky exprimant les étapes constituant le phénomène de fluorescence.

Le phénomène de fluorescence obéit à un certain nombre de règles décrites en détail en réf. [6] et dont les principales peuvent être résumées de la manière suivante :

- le spectre d'émission est le plus souvent indépendant de la longueur d'onde d'excitation,
- les spectres d'émission et d'absorption des composés fluorescents purs sont symétriques l'un de l'autre par rapport à un plan médian,
- la probabilité d'émission d'un photon par un fluorophore excité pur est généralement modélisée par une exponentielle décroissante :

$$I(t) = I_0 \exp\left(-\frac{t}{\tau}\right) \quad (1.10)$$

avec τ désignant la durée de vie du fluorophore et $I(t)$ la variation d'intensité lumineuse produite par le fluorophore excité par une impulsion laser.

La fluorescence intrinsèque des tissus est due à la présence dans l'organisme de certaines molécules, telles les porphyrines, les acides aminés tryptophane et tyrosine, les coenzymes NADH et NADPH, et les flavines. Les coenzymes fluorescent dans le bleu/vert et elles sont très sensibles aux changements métaboliques dans les cellules. Le niveau de fluorescence des tissus dans ces longueurs d'ondes est représentatif de l'efficacité de la chaîne respiratoire et de la présence éventuelles de lésions. Dans la région du spectre orange/rouge, la fluorescence intrinsèque est due principalement à la présence de porphyrines et metalloporphyrines. Plusieurs types de microorganismes pathologiques peuvent synthétiser des quantités importantes de ces substances dans les tissus, et la fluorescence permet de les localiser .

Les propriétés optiques des tissus, absorption, diffusion et fluorescence ayant été décrites, nous allons présenter la manière la plus classique de modéliser la propagation de la lumière dans les tissus vivants.

Chapitre 2

L'équation de la diffusion

La propagation de la lumière dans un milieu diffusant obéit aux équations de Maxwell. Cependant, dans le cas de milieux aussi complexes et hétérogènes que les milieux biologiques, ces équations sont impossibles à résoudre. Généralement, on fait abstraction des phénomènes d'interférence et de diffraction, pour ne s'intéresser qu'à la diffusion de l'énergie lumineuse. Cette approche énergétique, appelée équation de transfert radiatif, fait appel aux notions d'absorption et de diffusion que nous venons d'introduire. Les sources de lumière considérées sont celles de l'excitation, mais aussi de la présence d'éventuels marqueurs fluorescents. Le principal avantage de cette équation c'est qu'elle se simplifie avantageusement dans le cas de l'approximation de la diffusion. Cette approximation est valide si la distance entre l'entrée et la sortie de la lumière est grande devant l'_s (donné par l'équation 1.9 page 10) et si $\mu_a \ll \mu'_s$.

Après avoir défini le repère et les grandeurs physiques utilisés dans cette approche, nous présenterons l'équation de transfert radiatif et sa simplification dans le cadre de l'approximation de la diffusion.

2.1 L'équation de transfert radiatif

Pour présenter la manière par laquelle on modélise généralement la propagation de la lumière dans les tissus vivants, nous allons préciser le repère de travail, puis définir deux grandeurs essentielles, la luminance et la densité de photons.

2.1.1 Grandeurs utilisées pour décrire la propagation de la lumière

On définit la *luminance* $L(\vec{r}, \vec{\Omega}, t)$ par :

$$dP = L(\vec{r}, \vec{\Omega}, t) \cos \theta dS d\Omega \quad (2.1)$$

où dP représente la puissance lumineuse au temps t et au point r transitant par l'angle solide $d\Omega$ orienté suivant le vecteur unitaire $\vec{\Omega}$ depuis ou vers la surface apparente dS . Cette grandeur scalaire s'exprime donc en $[W.cm^{-2}.sr^{-1}]$. θ représente l'angle entre la normale à dS et $\vec{\Omega}$.

On définit également le *flux d'énergie diffusé* exprimé en $[W.m^{-2}]$:

$$\phi(\vec{r}, t) = \int_{4\pi} L(\vec{r}, \vec{\Omega}, t) d\Omega \quad (2.2)$$

Le *vecteur densité de flux diffus* $\vec{J}(\vec{r}, t)$ (*photon flux* ou *current density* en anglais) décrit la quantité d'énergie en circulation au point situé en r à l'instant t , et dans la direction $\vec{\Omega}$ (sa norme s'exprime également en $[W.m^{-2}]$)

$$\vec{J}(\vec{r}, t) = \int_{4\pi} L(\vec{r}, \vec{\Omega}, t) \vec{\Omega} d\Omega \quad (2.3)$$

2.1.2 Hypothèse P_1

D'après cette hypothèse, la luminance peut se décomposer en une composante isotrope (luminance diffuse) et une composante dépendante de la direction $\vec{\Omega}$ considérée. On peut montrer que ces deux composantes dépendent respectivement du flux d'énergie diffusé et du vecteur densité de flux diffus :

$$L(\vec{r}, \vec{\Omega}, t) = \frac{1}{4\pi} \phi(\vec{r}, t) + \frac{3}{4\pi} \vec{J}(\vec{r}, t) \cdot \vec{\Omega} \quad (2.4)$$

Appelons $\rho(\vec{r}, t)$ la densité d'énergie telle que :

$$\phi(\vec{r}, t) = \rho(\vec{r}, t) \times \frac{c}{n} \quad (2.5)$$

Alors l'hypothèse P_1 s'écrit :

$$L(\vec{r}, \vec{\Omega}, t) = \frac{\rho(\vec{r}, t)}{4\pi} \frac{c}{n} + \frac{3}{4\pi} \vec{J}(\vec{r}, t) \cdot \vec{\Omega} \quad (2.6)$$

A l'aide des grandeurs définies ci-dessus, nous allons déterminer l'équation qui régit la propagation de la lumière dans les tissus. Cette équation fondamentale est appelée équation de transfert radiatif.

2.1.3 L'Équation de Transfert Radiatif (ETR)

Cette équation a été introduite pour décrire les phénomènes de diffusion en astrophysique [7] puis en diffusion de neutrons [8], avant d'être appliquée au domaine de l'optique en général [9]. C'est une alternative aux équations de Maxwell, et le lien avec celles-ci peut-être établi. Cette équation correspond à un bilan d'énergie dans un petit élément de volume dV positionné en r . Elle s'écrit :

$$\begin{aligned} \frac{n}{c} \frac{dL(\vec{r}, \vec{\Omega}, t)}{dt} + \vec{\Omega} \cdot \nabla L(\vec{r}, \vec{\Omega}, t) + (\mu_a + \mu_s) L(\vec{r}, \vec{\Omega}, t) \\ = \mu_s \int_{4\pi} p h(\theta) L(\vec{r}, \vec{\Omega}', t) d\vec{\Omega}' + q(\vec{r}, \vec{\Omega}, t) \end{aligned} \quad (2.7)$$

- Le terme $\frac{n}{c} \frac{dL(\vec{r}, \vec{\Omega}, t)}{dt}$ correspond à la variation temporelle de la luminance dans cet élément de volume.
- $\Omega \cdot \nabla L(\vec{r}, \vec{\Omega}, t)$ correspond du flux sortant de l'élément de volume dans la direction $\vec{\Omega}$.
- $(\mu_a + \mu_s) L(\vec{r}, \vec{\Omega}, t)$ correspond à la perte de puissance lumineuse par absorption ou diffusion.
- $\mu_s \int_{4\pi} p h(\theta) L(\vec{r}, \vec{\Omega}', t) d\Omega'$ décrit l'intégrale de la puissance lumineuse provenant de toutes les directions et diffusant vers la direction $\vec{\Omega}$.
- Enfin $q(\vec{r}, \vec{\Omega}, t)$ exprime la présence éventuelle d'une source de lumière en \vec{r} (laser ou fluorophore).

Cette équation régit la propagation de la lumière dans un milieu diffusant pour une direction de propagation donnée. Cette approche est une alternative aux équations de Maxwell qui décrivent de manière plus fondamentale les phénomènes électromagnétiques. L'hypothèse P_1 permet d'obtenir une version plus simple de l'ETR : l'équation de la diffusion.

2.2 L'équation de la diffusion (ED)

L'hypothèse P_1 permet de simplifier l'ETR. On utilise également deux hypothèses supplémentaires :

- la variation lente du vecteur densité de flux diffus : $\frac{\partial \vec{J}(\vec{r}, t)}{\partial t} \approx 0$,
- la source de lumière est supposée isotrope (i.e. les termes de source non isotropes ne sont pas pris en compte).

Ces hypothèses permettent d'écrire le flux diffusé sous la forme d'une loi en fonction de la densité de photons :

$$\vec{J}(\vec{r}, t) = -D \nabla \phi(\vec{r}, t) \quad (2.8)$$

Des étapes de calculs conduisent à l'équation de la diffusion :

$$\frac{\partial \rho(\vec{r}, t)}{\partial t} - \nabla \cdot (D(\vec{r}) \nabla \phi(\vec{r}, t)) + \mu_a \phi(\vec{r}, t) = Q(\vec{r}, t) \quad (2.9)$$

avec $\rho(\vec{r}, t)$ la densité d'énergie définie par l'équation 2.5 et le coefficient D décrit par Patterson *et al.* dans la référence [10] et exprimé par :

$$D = \frac{1}{3(\mu_a + \mu'_s)} \quad (2.10)$$

Cette équation ne porte plus sur la luminance mais sur le flux d'énergie diffusé et la densité d'énergie qui sont proportionnels au coefficient n/c près. L'équation de la diffusion permet d'éliminer toute composante angulaire à l'ETR, ce qui simplifie considérablement sa résolution. De plus amples détails concernant les étapes permettant de simplifier l'ETR en équation de la diffusion sont disponibles en réf. [11, 10]

2.3 Solutions de l'équation de la diffusion

2.3.1 Solutions analytiques de l'ED en milieu infini et homogène : fonctions de Green

En faisant l'hypothèse que le coefficient de diffusion est une constante du milieu (milieu homogène), on obtient :

$$\frac{n}{c} \frac{\partial \phi(\vec{r}, t)}{\partial t} + D \Delta \phi(\vec{r}, t) + \mu_a \phi(\vec{r}, t) = Q(\vec{r}, t) \quad (2.11)$$

2.3.1.1 Solution dynamique (cas des mesures résolues en temps)

Dans le cas où la source de lumière est représentée par un Dirac spatial et temporel situé à l'origine : $Q(r, t) = \delta_{0,0}(r, t)$, la solution de l'ED prend la forme d'une fonction de Green donnée par la réf. [12] :

$$\phi(\vec{r}, t) = G(\vec{r}, t) = \frac{c}{(4\pi Dct)^{3/2}} \exp\left(-\frac{\|\vec{r}\|^2}{4Dct} - \mu_a ct\right) \quad (2.12)$$

2.3.1.2 Solution statique (cas de la mesure en continu)

On peut supprimer toute dépendance au temps dans le cas où l'on utilise un laser et un détecteur fonctionnant en continu, et l'équation 2.11 se réduit à :

$$\Delta \phi(\vec{r}) - k^2 \phi(\vec{r}) = -\frac{1}{D} Q(\vec{r}) \quad (2.13)$$

avec :

$$k^2 = \frac{\mu_a}{D} = 3\mu_a (\mu_a + \mu'_s) \approx 3\mu_a \mu'_s \quad (2.14)$$

Dans le cas où l'on prend une source de lumière ponctuelle $Q(\vec{r}) = \delta_s(\vec{r})$ située en \vec{r}_s , l'ED en continu prend la forme d'une équation de Helmholtz :

$$\Delta \phi(\vec{r}) - k^2 \phi(\vec{r}) = -\frac{1}{D} \delta_s(\vec{r}) \quad (2.15)$$

qui admet pour solution l'équation de Green suivante, définie $\forall \vec{r} \neq \vec{r}_s$ [13] :

$$G_s(r) = \frac{1}{4\pi D} \frac{\exp(-k \|\vec{r} - \vec{r}_s\|)}{\|\vec{r} - \vec{r}_s\|} \quad (2.16)$$

où $G_s(\vec{r})$ désigne le flux d'énergie diffusé au point \vec{r} induit par une source ponctuelle située en \vec{r}_s .

2.3.1.3 Interprétation physique de la fonction de Green

Les fonctions de Green, solutions de l'ED en milieu homogène, correspondent à un flux d'énergie diffusé. Elles associent une densité d'énergie lumineuse par unité de volume en un point A, à un flux d'énergie diffusé en un point B. On écrit donc :

$$d_{EL}(A, t) \rightarrow \phi(B, t) = G(\overrightarrow{AB}, t) \times d_{EL}(A, t) \quad (2.17)$$

avec $d_{EL}(A, t)$ désignant la densité d'énergie lumineuse au point A et $\phi(B, t)$ le flux d'énergie diffusé au point B. Du point de vue des unités, la fonction de Green permet de transformer une densité d'énergie [$J.cm^{-3}$] en un flux d'énergie diffusé [$W.cm^{-2}$].

Pour illustrer ce qu'elles représentent physiquement et également montrer comment les utiliser, on envisage deux cas de figure, qui seront les plus fréquents dans la suite de ce travail :

1. cas d'une lumière diffusant d'un point source vers un centre fluorescent situé en \vec{r} . Si la source émet une densité d'énergie lumineuse par unité de volume et par seconde à l'origine $d_{EL}(\vec{0}, t)$, alors l'énergie lumineuse d_{EL} émise par une inclusion fluorescente en \vec{r} s'écrira :

$$d_{EL}(\vec{r}, t) = \mu_a(\vec{r}) \times \eta(\vec{r}) \times C(\vec{r}) \times V(\vec{r}) \times G(\vec{r}, t) \times d_{EL}(\vec{0}, t) \quad (2.18)$$

avec μ_a désignant le coefficient d'absorption de l'inclusion fluorescente, η le rendement quantique du fluorophore considéré, C la concentration en fluorophore et V le volume de l'inclusion.

2. cas d'une source de lumière (source ou fluorophore) à l'origine et d'un détecteur placé en \vec{r} . Si la source émet une densité d'énergie lumineuse par unité de volume et par seconde à l'origine $d_{EL}(\vec{0}, t)$, alors la puissance lumineuse captée par le détecteur s'écrira :

$$P_D = G(\vec{r}, t) \times dS \times \frac{\Omega}{4\pi} \times d_{EL}(\vec{0}, t) \quad (2.19)$$

avec dS désignant la surface du détecteur et Ω son cône d'acceptance.

2.3.2 Solutions analytiques en milieu semi-infini : conditions aux limites

Il s'agit ici de déterminer des solutions analytiques pour des milieux « bornés », c'est-à-dire de prendre en compte des interfaces entre milieu diffusant et non-diffusant (conditions aux limites). En toute rigueur, il faudrait revenir à l'ED et la résoudre en prenant en compte les conditions aux limites. Plusieurs travaux ont permis d'aboutir à la condition aux limites dite « de Robin » ou du courant partiel décrites en réf. [14]. On peut également tenir compte des éventuelles réflexions internes dues aux variations d'indice à l'interface entre les deux milieux (problème de Milne [15]).

Un problème similaire se pose pour modéliser les sources de lumière directives (laser ou lumière sortant d'une fibre). On rappelle que pour obtenir l'ED, on a dû faire

l'hypothèse de sources isotropes. Pour ramener le cas des lasers à ce type de source, on introduit la notion de source virtuelle. Le faisceau laser est représenté par une source isotrope située à une distance $1/\mu'_s$ à l'intérieur du milieu diffusant.

2.3.3 Solutions numériques

Pour des géométries autres que celles des milieux infinis ou semi-infinis, il faut effectuer une résolution numérique de l'ED. Différentes méthodes existent pour résoudre les équations aux dérivées partielles, nous citerons les deux principales qui sont les différences finies, et les éléments finis. Ces méthodes présentent l'avantage de pouvoir calculer la solution pour une géométrie arbitraire avec éventuellement des inhomogénéités de coefficients optiques. La méthode des différences finies est basée sur la discrétisation de l'équation aux dérivées partielles. La méthode des éléments finis discrétise le domaine de calcul (maillage).

2.3.4 Domaine de validité de l'équation de la diffusion

Les hypothèses permettant de simplifier l'ETR ne sont pas valables dans tous les cas : l'une des limitations de l'ED vient de l'hypothèse $\mu_a \ll \mu'_s$. Cette hypothèse est satisfaite dans la plupart des milieux biologiques et dans le proche infra-rouge. Des études comparatives entre l'approximation de la diffusion et la théorie du transfert radiatif ont montré que les deux approches donnent des résultats similaires pour les régions où $\mu_a \ll \mu'_s$ mais pouvaient diverger si cette condition n'est pas remplie.

La seconde limite provient de l'approximation P_1 . Celle-ci implique que les variations spatiales de la densité de photons sont petites sur des distances de l'ordre de $1/\mu'_s$. Pour des études sur des objets de petites dimensions comme par exemple le cerveau du petit animal, le retour à l'ETR peut être nécessaire pour s'affranchir des erreurs liées à l'ED.

Chapitre 3

Méthodes d'imagerie optique in vivo

L'imagerie moléculaire optique regroupe un certain nombre d'approches, ayant en commun l'utilisation de la lumière visible (ou proche IR) comme moyen de détection. Ces approches peuvent être classées suivant la dimension du volume qu'elle peuvent imager, ainsi que par la résolution obtenue.

Elle peuvent, d'une part, fournir un contraste morphologique, en révélant les propriétés optiques d'un milieu (absorption, diffusion, fluorescence intrinsèque). Mais elles peuvent également fournir des informations fonctionnelles, par l'intermédiaire des spectres d'absorption des tissus qui varient significativement, en particulier en fonction de leur oxygénation. L'injection préalable de traceurs fluorescents permet de marquer certains types de tissus (tumeurs) ou de substances (médicaments) dont on souhaite déterminer la biodistribution.

3.1 Des outils adaptés aux différentes échelles d'observation

Plusieurs catégories de techniques permettent de faire de l'imagerie in vivo. Chacune de ces familles est adaptée à une échelle d'observation donnée (organe, vaisseau sanguin, cellule) et à certains éléments de contraste (absorption, diffusion ou fluorescence) que l'on cherche à visualiser. Généralement, la résolution optique de ces méthodes est inversement proportionnelle à la profondeur à laquelle on peut sonder les tissus. Le tableau 3.1 énumère les différentes techniques existantes, et précise la profondeur d'observation et la résolution moyenne obtenue. Il indique également si ces techniques peuvent être adaptées à une application clinique ou non (d'après la référence [16]).

On constate que la moitié des méthodes d'imagerie optiques in-vivo ne concerne que des épaisseurs très faibles de tissus (≤ 1 mm). Il s'agit pour certaines d'entre elles de techniques de microscopie in vitro ayant été adaptées à la mesure sur tissus vivants. D'autres techniques, telles que la Tomographie Optique de Cohérence (OCT) et l'imagerie de Speckle, essentiellement basées sur une mesure de la diffusion des tissus, permettent de combler le gap séparant les techniques microscopiques superficielles, et les techniques destinées à mesurer en profondeur (≥ 5 mm). Parmi ces dernières, on notera que c'est la tomographie moléculaire de fluorescence (FMT) qui permet d'at-

Table 1 Optical <i>in vivo</i> imaging systems ^a				
Technique	Contrast ^b	Depth	Commonly used wavelength	Clinical potential
Microscopic resolution				
Epi	A, FI	20 μ m	Visible	Experimental
Confocal	FI	500 μ m	Visible	Experimental
Two-photon	FI	800 μ m	Visible	Yes
Mesoscopic resolution				
Optical projection tomography	A, FI	15 mm ^c	Visible	No
Optical coherence tomography	S	2 mm	Visible, NIR	Yes
Laser speckle imaging	S	1 mm	Visible, NIR	Yes
Macroscopic resolution, intrinsic contrast				
Hyperspectral imaging	A, S, FI	<5 mm	Visible	Yes
Endoscopy	A, S, FI	<5 mm	Visible	Yes
Polarization imaging	A, S	<1.5 cm	Visible, NIR	Yes
Fluorescence reflectance imaging (FRI)	A, FI	<7 mm	NIR	Yes
Diffuse optical tomography (DOT)	A, FI	<20 cm	NIR	Yes
Macroscopic resolution, molecular contrast				
Fluorescence resonance imaging (FRI)	A, FI	<7 mm	NIR	Yes
Fluorescence molecular tomography (FMT)	FI	<20 cm	NIR	Yes
Bioluminescence imaging (BLI)	E	<3 cm	500–600 nm	No

^aNote that the combination of reporter probes (Table 2) and imaging system often imparts molecular specificity. ^bA, Absorption; E, emission; S, scattering; FI, fluorescence. ^cIn cleared specimen.

TABLE 3.1 – Liste des différents systèmes d’imagerie optique ayant des applications *in vivo* potentielles. Pour chaque système, ce tableau précise le type d’élément de contraste visualisé (A pour absorption, S pour diffusion et FI pour fluorescence). Ce tableau est issu de la réf. [16].

teindre les profondeurs les plus importantes. C’est principalement cette technique qui est mise en œuvre dans ce travail de thèse. Nous allons donc la développer dans la section suivante.

3.2 Méthodes optiques permettant de réaliser des mesures en profondeur

Dans la majorité des cas, l’imagerie directe est fortement limitée en terme de profondeur de pénétration par la diffusion de la lumière dans les tissus. Ainsi, pour pouvoir explorer des tissus très épais, l’approche tomographique consiste à détecter le signal optique multi-diffusé. Un modèle de propagation lumineuse basé sur l’ED, ou Monte Carlo, permet de simuler l’expérience réalisée (problème direct). La reconstruction de l’image consiste alors à résoudre un problème inverse. Cette méthode est connue sous le nom de Tomographie Optique Diffuse (DOT, ou FDOT si elle implique un marquage fluorescent).

Résoudre le problème inverse consiste à optimiser un critère représentant l’écart entre les valeurs obtenues par l’expérience et la modélisation. Il s’agit généralement de méthodes itératives permettant de converger vers une représentation 3D du paramètre que l’on souhaite reconstruire (carte d’absorption ou de fluorescence par exemple). Nous aurons l’occasion de mettre en œuvre deux de ces méthodes dans les deuxième et

troisième parties.

En tomographie optique, la profondeur d'exploration est uniquement limitée par les performances du système de détection. La résolution spatiale est plus difficile à définir que dans le cas de l'imagerie directe. Elle dépend bien évidemment des performances du système expérimental, mais elle est également étroitement liée à la modélisation et au processus d'inversion.

Il est possible de définir trois types de DOT suivant les informations qu'ils recueillent.

1. *Tomographie optique continue* (CWDOT) : ces systèmes utilisent une source continue balayant l'échantillon et mesurent l'intensité lumineuse totale $I = \int I(t) dt$ ressortant à la surface du tissu. Le coût réduit et les performances en termes de stabilité et de rapport signal sur bruit de ce genre d'instrumentation ont contribué à la démocratisation de ces appareils. En revanche, ils recueillent moins d'information que les systèmes prenant en compte l'information temporelle et imposent en conséquence de multiplier le nombre de mesures. Un système basé sur cette méthode est développé dans la deuxième partie page 49.
2. *Tomographie optique fréquentielle*. Les systèmes fréquentiels utilisent des sources de lumière modulées à des fréquences radios. En plus de l'intensité totale $I = \int I(t) dt$, ils mesurent également le déphasage $\Delta\varphi$ entre le signal incident et le signal détecté, ainsi que la variation de l'indice de modulation M du signal. De performances équivalentes et de coût voisin aux systèmes continus, ils permettent de recueillir plus d'informations que ces derniers.
3. *Tomographie optique résolue en temps* (TRDOT). Les systèmes résolus en temps utilisent des sources impulsionnelles ultracourtes et mesurent le profil temporel $I(t)$ de l'intensité lumineuse qui ressort des tissus. Ces systèmes sont souvent plus onéreux et délicats à stabiliser que les systèmes continus ou modulés. La transformée de Fourier établit une équivalence entre les mesures dans les domaines temporels ou fréquentiels. Toutefois les systèmes fréquentiels ont une bande passante plus limitée, typiquement inférieure au GHz. C'est la raison pour laquelle les systèmes résolus en temps sont actuellement ceux qui récoltent le plus d'information. Les sources sont généralement des lasers femto ou picoseconde ($50 fs \leq \Delta\tau \leq 100 ps$). Divers types d'instrumentation optoélectronique sont utilisés pour la détection, notamment les caméras rapides intensifiées et les systèmes de comptage de photons. Nous aurons l'occasion de revenir en détail sur ce genre d'instrumentation dans la troisième partie page 98.

Ces méthodes de tomographie optique peuvent être déclinées suivant deux approches, parfois utilisées de façon complémentaire :

- les approches basées sur la mesure des *propriétés endogènes* des tissus (absorption, diffusion, et fluorescence endogène), notions introduites au chapitre 1. Ces méthodes sont appelées « endogènes » ou « sans marquage ».
- les approches impliquant l'injection ou la présence préalable dans les tissus de *marqueurs fluorescents* ou *bioluminescents*. Ces marqueurs dits extrinsèques, peuvent être localisés par des moyens optiques, ce qui permet d'améliorer le contraste de l'image, voire d'observer certains phénomènes particuliers dans les tissus. Il s'agit des méthodes « avec marquage ».

Les différentes techniques optiques mises en jeu dans ces deux catégories d’approches sont décrites dans les deux sections suivantes (3.3 et 3.4).

3.3 Méthodes tomographiques basées sur la mesure des propriétés optiques endogènes des tissus

3.3.1 Méthodes continues

Le principe des méthodes continues consiste à mesurer l’intensité de la lumière diffusée entre plusieurs points répartis à la surface du tissu. En réalisant ces mesures à plusieurs longueurs d’onde, l’équation 1.3, page 6, permet d’établir un système de plusieurs équations dont les inconnues sont les concentrations en $[Hb]$ et $[HbO_2]$. En inversant le système ainsi obtenu, on peut alors déterminer la carte d’absorption, ainsi que le taux d’oxygénation des tissus. Les inconvénients de ces méthodes sont d’une part l’impossibilité de réaliser une mesure absolue, et d’autre part l’apparition d’artefacts liés au déplacement des tissus. Elles présentent toutefois l’avantage d’être de faible coût et miniaturisables. Elles sont donc, par exemple, adaptées à l’étude fonctionnelle du cerveau ou aux tests de réaction à un médicament (cas pour lesquels des mesures relatives suffisent) [17, 18].

Une variante de cette méthode consiste à faire des mesures en fréquence spatiale. Il s’agit toujours de mesures continues, mais cette fois, en éclairant le tissu à l’aide d’une lumière structurée, par exemple une alternance de lignes lumineuses et sombres. Ce type d’imagerie a permis de faire des mesures absolues, par exemple sur gros animal [19].

3.3.2 Méthodes résolues en temps

La *Spectroscopie Résolue en Temps* (TRS) consiste à mesurer le temps de vol en plus de l’intensité lumineuse après son passage au travers des tissus. Pour cela, on envoie un pulse lumineux bref (de 50 fs à 100 ps) et on mesure la TPSF pour « *Time Point Spread Function* » de la lumière après son passage au travers des tissus. En raison de la diffusion, l’impulsion lumineuse s’étale et son intensité est réduite par l’absorption. Le résultat est un histogramme indiquant le nombre de photons classés en fonction de leur temps d’arrivée respectif. Cette technique permet de voir en profondeur car elle distingue les photons les plus tardifs qui ont parcouru un chemin plus long dans les tissus. Elle distingue également mieux les coefficients d’absorption et de diffusion. L’inconvénient est qu’elle requiert une instrumentation sophistiquée. Du point de vue clinique, ce sont des instruments volumineux qui nécessitent des chaînes de comptage ou une caméra rapide intensifiée, plus sensibles mais plus coûteuses et susceptibles d’être endommagées par la lumière ambiante. Un exemple de mise en œuvre de cette technique appliquée à la mammographie est présenté en réf. [20]. Dans le futur, on ne peut exclure que des progrès technologiques permettront de diminuer les coûts et l’encombrement de ces instruments. Le chapitre 5 de la troisième partie de ce document montre comment cette technique peut également être adaptée à la localisation d’inclusions fluorescentes dans un contexte clinique réaliste, celui du diagnostic du cancer de la prostate.

3.3.3 Méthodes fréquentielles

La *Spectroscopie par Modulation de Phase* (PMS) est dans son principe équivalente à la TRS. La différence vient du fait qu'elle opère dans le domaine fréquentiel. La source de lumière est modulée en intensité avec des fréquences radio comprises entre 50 MHz et 1GHz. Après la traversée des tissus, on mesure l'intensité moyenne (DC), l'amplitude (AC) et la phase du signal lumineux. Cette phase contient l'information sur les temps de vol. Mais pour obtenir autant d'information qu'avec le TRS, il faut balayer en fréquence de 50 MHz à 1 GHz. Le résultat obtenu est la transformée de Fourier de la Time Point Spread Function (TPSF) obtenue en TRS. Tout se passe comme si la traversée des tissus était un système dont on mesure la réponse impulsionnelle en faisant varier manuellement les fréquences d'entrée, de manière à construire la courbe de gain en fonction de la fréquence. Rares sont les instruments fonctionnant en balayage de fréquence, car la résolution temporelle obtenue par cette méthode est relativement basse. La plupart des instruments sont mono-fréquentiels afin de simplifier l'instrumentation, de la rendre plus facilement transportable et meilleur marché. C'est pour cette raison que ces appareils sont considérés à l'heure actuelle comme les plus adaptés au milieu clinique. Cette méthode, appliquée à la mammographie, a notamment permis [21] de distinguer des tumeurs malignes de tumeurs bénignes sur 60 patientes, avec une sensibilité de 91%. L'avantage de cette technique sur la précédente, réside en un meilleur rapport signal sur bruit, par analogie avec la détection synchrone. Cependant, comparées à la TRS, les méthodes basées sur la mesure d'une seule fréquence donnent moins d'information sur les propriétés des tissus [22].

3.3.4 Positionnement des méthodes endogènes par rapport à celles basées sur un marquage fluorescent

Toutes les méthodes que nous venons de décrire sont basées sur la mesure de l'absorption et de la diffusion des tissus vivants. Elles présentent l'avantage d'être totalement non-invasives (pas de marqueur injecté) et peuvent donc être rapidement mises en œuvre en clinique. Les processus biologiques que l'on souhaite détecter (cancer) induisent des variations locales d'absorption et de diffusion du simple au double [23] : les lésions contiennent environ deux fois plus d'hémoglobine que les tissus sains. Ce niveau de contraste, aisément distinguable pour des tissus proches de la surface l'est beaucoup moins à plusieurs centimètres de profondeur. Notamment, les récentes études conduites sur des patientes pour la détection de tumeurs mammaires ont montré qu'il était difficile de détecter les lésions situées près de la cage thoracique [21].

Les techniques basées sur la fluorescence permettent d'accroître le contraste entre les tissus sains et malades de manière à améliorer la profondeur de détection et la résolution obtenue après reconstruction. Par exemple, des marqueurs fluorescents de type quantum-dots (QD) non-spécifiques, développés par le Frangioni's laboratory [24], ont permis d'atteindre des rapports de signaux entre tumeur bénigne et maligne de 2,8 et un rapport tumeur/tissus sains de 5. Dans le cas de QD spécifiques, basés sur un récepteur cRGD, le ratio de signal bénin/malin devient 5,1 et le rapport tumeur/tissus sains devient 6,9. Le gain en contraste apporté par un marquage fluorescent, spécifique

ou non, par rapport à des mesures endogènes est donc important.

Cependant, la mise en œuvre de marqueurs fluorescents nécessite au préalable de démontrer leur non-toxicité, et d'évaluer le rapport bénéfice sur risque, ce qui constitue une procédure souvent longue et coûteuse. La section suivante décrit les systèmes basés sur un marquage fluorescent des tissus.

3.4 Systèmes basés sur le marquage fluorescent ou bioluminescent

3.4.1 Les marqueurs fluorescents

Dans le cadre de certaines applications médicales, on injecte au patient un marqueur fluorescent qui va se fixer spécifiquement sur les régions cibles que l'on souhaite mettre en évidence. Il peut s'agir par exemple d'une tumeur dont on souhaite observer l'évolution. Le marqueur peut également être attaché à un médicament dont on va observer l'effet sur une maladie particulière, ce qui permet de contrôler son efficacité.

Les marqueurs fluorescents sont utilisés depuis longtemps en biologie. Cependant, tous ne peuvent être utilisés dans le cadre de l'optique *in vivo*. En effet, pour être candidat à une utilisation *in vivo*, un fluorophore doit présenter les caractéristiques suivantes :

1. ne présenter *aucune toxicité* en particulier en cas d'application clinique
2. des longueurs d'ondes d'excitation et d'émission comprises dans la *fenêtre thérapeutique* définie au paragraphe 1.1.2
3. un rendement quantique élevé
4. un caractère *hydrophile* (soluble dans le sang)
5. une furtivité au système immunitaire
6. une élimination rapide de l'organisme après fixation sur la zone d'intérêt (« clearance rate »).

Le premier de ces caractères, la faible toxicité, est une des critiques récurrentes de l'approche par marquage. Aussi y consacrons-nous les paragraphes 3.4.2 et 3.4.3.

On distingue deux familles de marqueurs fluorescents : les marqueurs exogènes, c'est-à-dire étrangers au tissu étudié, et les marqueurs endogènes, générés par le tissu.

3.4.1.1 Marqueurs exogènes

Parmi les marqueurs exogènes, on distingue ceux qui sont spécifiques, c'est-à-dire qui possèdent une affinité avec certaines cellules, les cellules tumorales par exemple, et ceux qui ne le sont pas.

Les *marqueurs non spécifiques* n'ont pas de récepteurs leur permettant de se fixer sur les cellules tumorales. Ils iront cependant préférentiellement se loger dans les tumeurs en raison de la forte vascularisation de celles-ci par simple transport ou par liaison avec des protéines du plasma. On peut citer comme exemple de marqueur non-spécifique le

Vert d'Indocyanine (ICG pour Indocyanin Green, $\lambda_{ex}/\lambda_{em} = 780/830 \text{ nm}$ [25]) qui a été approuvé dans les années 70 pour les injections à l'homme dans le cadre de tests hépatiques et ophtalmologiques [26]. Les marqueurs non-spécifiques sont peu onéreux et constituent un point de comparaison bien établi. Leur limite principale provient du bruit de fond important qu'ils génèrent en raison de leur non spécificité. Une version améliorée de ce marqueur, le Lipidot, développé au DTBS, est mis en œuvre dans le chapitre 5 de la troisième partie.

Les *marqueurs spécifiques* ont été développés afin de contrecarrer cet inconvénient. Ils sont constitués d'une part d'un marqueur fluorescent et d'autre part, d'un ligand spécifique. Ce ligand peut être un anticorps, une protéine ou un peptide par exemple. Cependant, même si le rapport signal à bruit est amélioré par rapport aux marqueurs non spécifiques, il reste encore un bruit de fond ou une accumulation possible dans certains organes, tels que le foie et les reins. Un exemple de marqueur spécifique, le RAFT- $c(RGD)_4$ -Alexa Fluor 700 est présenté sur la figure 3.1. Il sera mis en œuvre dans la deuxième partie, page 67.

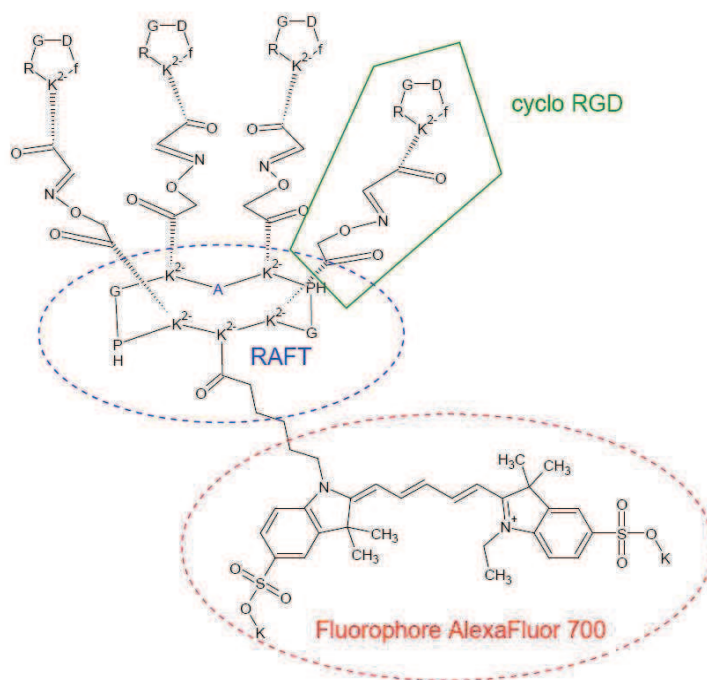


FIGURE 3.1 – Un exemple de marqueur fluorescent spécifique développé par l'Université Grenoble 1, l'INSERM, et le CEA-LETI [27] : le $RAFT - (cRGD)_4 - AlexaFluor700$. La partie *RAFT* de la molécule est un support pour 4 groupements peptides de type arginine-glycine-aspartate (*RGD*) qui sont spécifiques d'un type particulier de marqueurs membranaires, l'intégrine $\alpha_V\beta_3$, qui est surexprimée en cas de néoangiogénèse (formation de vaisseaux autour d'une tumeur cancéreuse).

Une manière d'améliorer encore les choses consiste à utiliser des marqueurs actifs.

Les *marqueurs activables* ne sont fluorescents qu'une fois activés par un environnement chimique particulier. Ces molécules sont généralement constituées d'une partie fluorescente et d'une partie « quencher » absorbant la fluorescence. Dans des conditions normales, ces marqueurs activables ne fluorescent pas. En revanche, dans certaines circonstances, par exemple en présence d'une enzyme, les deux parties se séparent et la partie fluorescente devient active. Cette méthode est très avantageuse du point de vue de la spécificité du signal. Elle nécessite cependant des développements chimiques importants, et dans le cas d'une application clinique, des essais de toxicité plus importantes.

3.4.1.2 Marqueurs endogènes

Les marqueurs endogènes sont exclusivement destinés à l'imagerie préclinique. En effet, certains gènes du petit animal peuvent être modifiés génétiquement de telle sorte que les cellules produisent des protéines fluorescentes. Ces gènes sont appelés « gènes rapporteurs ». Les deux systèmes de gènes rapporteurs les plus répandus sont celui de la famille des GFP (Green Fluorescent Protein) et la Luciférase qui émet de la lumière par bioluminescence lors de l'activation de son substrat en présence d'ATP.

Nous allons nous intéresser essentiellement à la fluorescence générée par l'injection de marqueurs exogènes ; ces marqueurs permettent de cibler un nombre plus grand de phénomènes biologiques. L'utilisation de tels marqueurs dans un cadre clinique, c'est-à-dire sur des patients malades, est encadrée par *la législation européenne*.

3.4.2 Règles fixées par la législation européenne concernant l'injection de marqueurs

L'utilisation de tels marqueurs dans un cadre clinique, c'est-à-dire sur des patients malades, est encadrée par les mêmes règles juridiques que celles qui régissent les médicaments. Avant de démarrer des essais cliniques, des études précliniques doivent être conduites. Le but de ces études est de démontrer l'apport de la nouvelle technique (le marqueur) par rapport aux techniques standard utilisées.

3.4.2.1 Études précliniques

1. *Études in vitro*. Le but de ces études est de montrer, par exemple, l'affinité entre le marqueur et les cellules cibles, lors d'essais *in vitro* (bioassays). Il s'agit alors de montrer que le marqueur va se fixer préférentiellement sur les cellules visées (cellules tumorales).
2. *Études in vivo*. Ces études doivent être réalisées sur un modèle animal reconnu comme comparable au modèle humain dans le type de pathologie considéré (exemple : souris pour le cancer, chien pour la prostate). Cette étude doit mettre en évidence l'apport du marqueur par rapport au protocole existant. On doit montrer par exemple, que le contraste des images obtenu est meilleur, ou bien que l'on parvient à mieux opérer une tumeur à l'aide du marquage.
3. *Études de toxicité*. Cette étape importante consiste à évaluer la toxicité du marqueur sur un modèle animal approprié (on utilise fréquemment le rat pour cette

étape). On doit pour cela suivre un protocole très précis, qui dure au minimum un mois, durant lequel les animaux sont exposés à des doses variables du marqueur testé. On s'intéresse en particulier aux réactions immunitaires de l'animal face au produit.

3.4.2.2 Études cliniques

Phase I : essais sur des volontaires sains. Dans le cas où la molécule ne représente pas de danger important, cette première étude clinique est menée sur des volontaires sains (typiquement, une dizaine). On cherche à connaître la pharmacocinétique ADME de la molécule. Ce sigle signifie :

- A = la vitesse de passage dans le sang à partir d'une solution orale
- M = la vitesse de métabolisation (transformation biologique par le foie et d'autres organes)
- D = la vitesse de distribution et de répartition dans les différents tissus à partir du compartiment plasmatique
- E = la vitesse d'élimination de la molécule par l'organisme, en anglais « clearance rate ».

Phase II : phase thérapeutique pilote. Cette deuxième phase, réalisée sur patients volontaires (quelques centaines), a pour but de déterminer la relation entre la dose et l'effet. Dans le cas d'un marqueur, il s'agit de mesurer l'amélioration du traitement ou du diagnostic apportée par la technique de marquage, en fonction de la dose de celui-ci. Cette étape servira à déterminer à terme la posologie.

Phase III : évaluation de l'efficacité clinique. Cette dernière étude a pour objectif de valider l'efficacité réelle de la nouvelle technique en clinique. Il s'agit en particulier d'évaluer le bénéfice du nouveau traitement par rapport aux risques éventuels que celui-ci fait courir aux patients (effets secondaires). Cette étape, très coûteuse, est réalisée sur un groupe de plusieurs centaines à quelques milliers de patients.

Autorisation de mise sur le marché (AMM en Europe). On constitue alors un dossier incluant les résultats des études de toxicité animale et des phases I, II et III des essais cliniques. Ce dossier est alors soumis à l'EMA (European Medicine Agency) qui délivre l'autorisation de mise sur le marché si les résultats obtenus sont satisfaisants.

Il résulte de cette procédure un délai important entre la découverte du marqueur et son emploi clinique. Ces délais, ainsi que les coûts importants liés aux études cliniques, ont amené certaines équipes de recherche à privilégier les techniques d'imagerie fonctionnelle sans marquage (mesure des coefficients d'absorption par exemple).

Cependant, les avantages nombreux du marquage fluorescent (spécificité, contraste, capacité à être fixé sur un médicament, sur un type de cellule) nous pousse à faire le pari de son développement futur.

3.4.3 État actuel des connaissances quant à la toxicité des marqueurs fluorescents

Les seuls marqueurs fluorescents approuvés pour une injection à l'homme sont le *vert d'indocyanine* (ICG) et la *fluorescéine* (mais cette dernière n'est pas située dans la fenêtre physiologique).

Une étude récente, menée par Alford et al. [26], a fait le point sur les différentes études de toxicité menées sur un panel de 18 fluorophores les plus fréquemment utilisés. Il s'agit notamment de Alexa Fluor 488 et 514, BODIPY FL, BODIPY R6G, Cy5.5, Cy7, cypate, fluorescein, indocyanine green, Oregon green, 8-phenyl BODIPY, rhodamine 110, rhodamine 6G, rhodamine X, rhodol, TAMRA, Texas red, et Tokyo green. D'après cette étude, la quantité de fluorophore que l'on prévoit d'injecter pour réaliser de l'imagerie in vivo est largement en dessous des doses toxiques décrites dans la littérature, ce qui est très encourageant.

De plus, le développement de marqueurs efficaces et non toxiques ne peut se faire sans la présence d'instruments capables de les détecter et d'évaluer leur efficacité. Le paragraphe suivant présente les différents systèmes existants permettant de détecter ces traceurs.

3.4.4 Méthodes optiques de localisation des marqueurs

3.4.4.1 Imagerie de Fluorescence par Réflexion

Le système d'*Imagerie de Fluorescence par Réflexion* (FRI) est le plus simple dans la panoplie des outils optiques disponibles en imagerie moléculaire. Il est en effet constitué d'une source de lumière continue et spatialement étendue, ainsi que d'un dispositif d'imagerie 2D (caméra) devant lequel on a placé un filtre de fluorescence (figure 3.2).

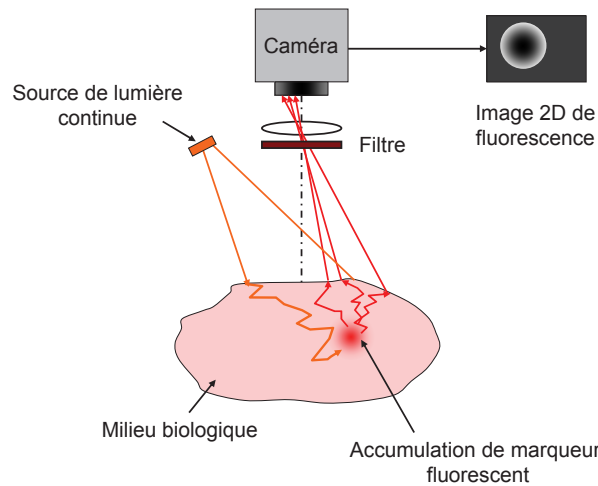


FIGURE 3.2 – Principe de fonctionnement d'un système d'Imagerie de Fluorescence en Réflexion.

De tels systèmes, inspirés des techniques de vision industrielle, sont appliqués aussi bien à des études sur le petit animal que sur l'homme.

La plupart des systèmes consacrés au petit animal utilisent une caméra CCD refroidie, en raison de temps d'intégration pouvant être supérieurs à quelques secondes, et un éclairage constitué soit d'un laser, soit, plus rarement, d'une lampe. On peut citer comme exemple d'instruments commerciaux, le IVIS Spectrum proposé par Caliper Life Science et le Night Owl par Berthold. On trouve également des appareils similaires chez Biospace, Hamamatsu ou Kodak. Notre laboratoire a également développé un système basé sur une couronne de plusieurs centaines de diodes électroluminescentes bicolores, figure 3.3, procurant un champ d'illumination homogène de 10 cm de diamètre environ ¹.



FIGURE 3.3 – Système d'Imagerie de Fluorescence en Réflexion appliqué à l'imagerie du petit animal développé par notre laboratoire.

Par ailleurs, un tel dispositif équipe le tomographe continu décrit dans la deuxième partie.

On trouve également des appareils de FRI dans le domaine clinique, notamment pour le diagnostic péroopératoire. Le principe est le même que pour l'animal; on injecte au patient un composé fluorescent ciblant la tumeur. En éclairant le champ opératoire, on détecte sur une caméra sensible la présence de tumeurs fluorescentes. General Electric propose sur catalogue le système d'imagerie péroopératoire développé par une équipe du Beth Israel Deaconess Medical Center [28]. Hamamatsu propose une sonde compacte en fluorescence qui a déjà été testée sur trente trois patientes, avec un taux d'efficacité de 94% pour la détection du ganglion sentinelle dans le cancer du sein [29]. Cette sonde ne fonctionne pas en éclairage ambiant et nécessite d'éteindre la lumière dans la salle d'opération pour effectuer la mesure. La principale limite de cette technique est sa faible capacité à détecter des phénomènes situés à une profondeur supérieure à quelques millimètres. Les tumeurs profondes par exemple, même dans le cas de l'épaisseur d'un petit animal, n'apparaissent pas en FRI ou sont rendues « floues » par la diffusion de la lumière.

1. Ce système est actuellement commercialisé par Hamamatsu

C'est pour contrer ces limitations qu'une nouvelle technique, la *tomographie de fluorescence diffuse*, en anglais Fluorescence Diffuse Optical Tomography (FDOT) a été développée.

3.4.4.2 Tomographie de Fluorescence Diffuse (FDOT)

Cette méthode permet d'obtenir une cartographie 3D de la présence des marqueurs fluorescents dans les tissus [30]. Au contraire des systèmes d'imagerie par réflexion, la plupart des tomographes basés sur la fluorescence fonctionnent à l'aide d'une source ponctuelle et en géométrie de transmission, car celle-ci permet de limiter la perturbation due à l'autofluorescence des tissus. C'est ce type d'instrumentation qui est développé dans la deuxième partie. La source de lumière laser est placée au-dessous de l'animal et se déplace pour décrire une grille régulière de 10 par 10 positions d'acquisition, avec un pas régulier typique de 2 mm. Pour chaque position du laser, deux images sont généralement acquises : une image de diffusion, et une image de fluorescence après positionnement du filtre sélectionné selon le fluorophore choisi pour le marquage. Les deux piles d'images obtenues permettent de remonter à la carte 3D de fluorescence de l'animal par l'intermédiaire d'un algorithme de reconstruction (figure 3.4).

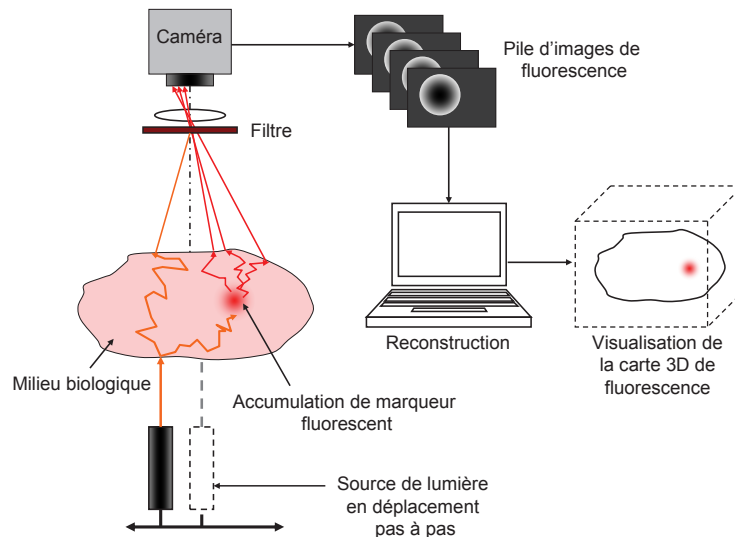


FIGURE 3.4 – Principe de fonctionnement d'un tomographe optique de fluorescence basé sur des mesures en continu.

Des méthodes de reconstruction permettant de tenir compte à la fois du caractère hétérogène des tissus de l'animal et de sa forme complexe ont été développées. L'une d'entre elles, couramment employée, consiste à normaliser les mesures par une approximation dite de Born [31]. Une autre méthode qui sera détaillée dans la deuxième partie, page 60, consiste à reconstruire une carte d'atténuation des tissus de l'animal à l'aide des images de diffusion. Cette carte est ensuite utilisée par l'algorithme, conjointement aux mesures de fluorescence, pour reconstruire la distribution de la fluorescence dans l'animal.

L'instrumentation de mesure continue est peu onéreuse et relativement compacte, l'essentiel de la place étant occupé par le système d'anesthésie. La limite principale de cette technique est sa difficulté à prendre en compte des milieux fortement absorbants et hétérogènes, problématiques qui seront abordées en détail au cours de la deuxième partie, en particulier dans les chapitres 1 et 3. De plus, la résolution suivant l'axe Z (axe reliant le laser au détecteur) des systèmes commerciaux peine à atteindre 5 mm pour une souris d'épaisseur 1,5 cm. Dans les autres axes (X et Y) on peut cependant atteindre une résolution quasi-millimétrique pour des objets d'épaisseur centimétrique. On notera que l'on peut s'affranchir de cette deuxième limite en effectuant un balayage cylindrique de l'échantillon lorsque cela est possible (petit animal). Une seconde limitation tient au fait qu'on ne peut pas différencier en continu les coefficients μ_a et μ'_s . Ceci limite la reconstruction des inhomogénéités et donc la sensibilité et la résolution.

Les premiers essais cliniques de la technique FDOT continue ont été réalisés par l'équipe de A. Yodh qui a présenté des études cliniques à l'aide d'un appareil de mammographie basé sur des mesures de type FDOT [32] avec un marquage par ICG. Ce système sera présenté plus en détail lors du positionnement par rapport à l'état de l'art de la troisième partie.

Pour améliorer la résolution des cartes de fluorescence et accroître l'épaisseur des tissus pouvant être analysés, une autre catégorie de systèmes a vu le jour. Il s'agit de la tomographie de fluorescence résolue en temps.

3.4.4.3 Tomographie de fluorescence résolue en temps

Ces systèmes, basés sur une source de lumière impulsionnelle et un détecteur résolu en temps, reprennent le principe de ceux, déjà évoqués, destinés à mesurer la concentration en hémoglobine. Sur le plan instrumental, les différences sont tout de même importantes puisqu'il s'agit de travailler avec moins de signal, en raison du rendement relativement faible de la fluorescence. La puissance moyenne des lasers utilisés pour les mesures d'absorption ($P \approx 1 \text{ mW}$) est insuffisante pour traverser les tissus et induire un signal de fluorescence détectable. On utilise donc des lasers plus puissants, la contrainte haute étant la limite d'échauffement des tissus (typiquement $P_{moyen} = 30 \text{ mW.mm}^{-2}$ pour un laser picoseconde à 775 nm).

Sur le plan de la méthode de localisation, les mesures temporelles contiennent un volume de données trop grand pour être traité par les mêmes méthodes que celles de la tomographie continue, en raison de l'ajout de la quatrième dimension (le temps). Pour simplifier, des algorithmes basés sur le calcul des moments des distributions temporelles ont été développés.

Keren et al. [33] ont comparé les performances d'un tomographe de fluorescence en continu (IVIS3D par Xenogen) et un autre basé sur le temps résolu ainsi que sur la fluorescence (eXplore Optix par Advanced Research Technologies-GE Healthcare). Ces deux tomographes sont basés sur une géométrie de transmission. Cette étude a mis en évidence les performances obtenues par l'appareil résolu en temps :

- une meilleure sensibilité (concentration minimum détectable 10 fois supérieure à celle obtenue en continu),
- une résolution spatiale plus fine (millimétrique),

- une plus grande profondeur de localisation.

L'enjeu des systèmes de tomographie de fluorescence basés sur le temps résolu consiste à mesurer un signal affaibli d'une part par le rendement limité de la fluorescence et d'autre part en raison de l'épaisseur des tissus traversés. En outre, les tissus sains ne sont jamais neutres sur le plan de la fluorescence. Ils présentent un niveau de fluorescence non négligeable, dû pour une part à la présence de certaines molécules (pyridines), mais également à la présence non-spécifique du marqueur fluorescent. Les seuls systèmes de tomographie de fluorescence résolus en temps sont apparus pour une application à l'imagerie du petit animal [34, 35]. Des systèmes appliqués à la mammographie ont été proposés, mais il n'y a pas encore d'étude clinique basée sur la tomographie de fluorescence résolue en temps. La troisième partie sera consacrée à ce type de système.

3.5 Position actuelle de la tomographie optique par rapport aux techniques traditionnelles de l'imagerie clinique

3.5.1 Positionnement par rapport à l'IRM

L'imagerie par résonance magnétique (IRM) est très utilisée en imagerie moléculaire et fonctionnelle. Elle utilise l'effet d'un champ magnétique intense sur le spin des protons. Elle présente l'avantage de proposer des images hautement résolues et de permettre un suivi fonctionnel et morphologique en temps réel. Les biomarqueurs utilisés en IRM sont des molécules ayant des propriétés paramagnétiques. Au départ, le gadolinium était utilisé comme simple agent de contraste, mais plus récemment, sont apparus sur le marché des marqueurs superparamagnétiques (nanoparticules d'oxyde de fer). Ces marqueurs ont la propriété de se fixer sur les tissus sains (foie) mais pas sur les régions présentant des anomalies (tumeurs ou cicatrices), ce qui nous permet de parler d'imagerie moléculaire. On peut également observer la consommation des tissus en oxygène et cela sans limitation de profondeur. Tout comme l'imagerie optique, les examens IRM sont considérés à ce jour sans risque sur l'organisme [36, 15]. Cependant, en termes de sensibilité, l'IRM peut difficilement détecter des concentrations inférieures à $10^{-5} \text{ mol.L}^{-1}$.

L'imagerie optique semble donc proposer une meilleure sensibilité de détection, avec un coût instrumental bien moindre, mais à une profondeur plus limitée que l'IRM.

3.5.2 Positionnement par rapport au SPECT

Les biomarqueurs utilisés dans ce type d'imagerie émettent des rayons gamma. Suivant le type d'application visée, on utilise tel ou tel type de radioisotope comme par exemple ^{99m}Tc , ^{111}In , ^{123}I , ^{201}Tl . La durée de vie des radioisotopes est relativement longue, de quelques heures à plusieurs jours, ce qui facilite leur production. Le coût réduit de cette technique, comparé à l'IRM et au PET, constitue son avantage principal. De plus, l'utilisation des hautes énergies permet de pénétrer plus profondément dans les tissus.

Cependant la résolution spatiale de cette technique est relativement limitée. De plus, en raison de la radioactivité des marqueurs, et pour des raisons de sécurité, elle n'est pas applicable à des essais en série sur un même patient ou animal, contrairement à l'imagerie optique. Enfin, cette modalité d'imagerie implique un suivi permanent des traceurs radioactifs, des contraintes de stockage et une logistique d'approvisionnement importante et contraignante.

3.5.3 Positionnement par rapport au PET

Cette technique consiste à fixer sur le biomarqueur un isotope émettant des positrons. Lors d'une désintégration, le positron émis se recombine presque instantanément avec un électron du voisinage ce qui entraîne l'émission de deux rayons gamma de même énergie (511 KeV) à 180° l'un de l'autre. Ces photons sont alors détectés par l'instrument qui élimine le bruit à l'aide d'un détecteur de coïncidences. On peut ainsi estimer la densité de désintégrations dans une certaine zone. Le biomarqueur le plus souvent utilisé est un sucre marqué par du Fluor¹⁸. Ce composé permet d'imager les cellules à fort métabolisme (cellules cancéreuses).

Le principal inconvénient du PET est qu'il implique que les isotopes soient générés à l'aide d'un cyclotron, machine volumineuse et très coûteuse. Etant donné que les isotopes ont une durée de vie de seulement quelques heures, la machine doit être présente sur le site, ce qui constitue une contrainte importante. Tous ces facteurs font du PET une technique très coûteuse. Cependant, elle n'a pas son pareil en termes de sensibilité de détection : un PET peut typiquement détecter des concentrations allant de 10^{-11} à $10^{-12} \text{ mol.L}^{-1}$ [37]. L'imagerie optique moléculaire est un peu moins sensible, limitée à $\sim 10^{-9} \text{ mol.L}^{-1}$ (voir paragraphe 4.2.4), et limitée en profondeur d'investigation, mais elle est beaucoup moins coûteuse en termes d'instrumentation et moins contraignante d'un point de vue logistique.

3.5.4 Positionnement par rapport à l'échographie

Les imageries optique et ultrasonore sont assez similaires par de nombreux aspects : leur coût est équivalent, elles sont assez peu invasives, et sont toutes deux capables d'imagerie fonctionnelle. Les marqueurs fonctionnels de l'échographie sont des microbulles de gaz injectées par voie intraveineuse. Ces microbulles ont un degré d'échogénéicité importante, largement supérieur à celui des tissus environnants. Cette technique peut être utilisée pour imager des vaisseaux sanguins dans des organes, pour mesurer des flux sanguins dans le cœur. Elle peut être utilisée en imagerie moléculaire, en fonctionnalisant les microbulles avec des ligands spécifiques des tissus malades. Cependant, à l'heure actuelle, cette technique n'a pas encore été approuvée pour une utilisation clinique, tout comme la plupart de celles qui utilisent des marqueurs fluorescents.

Actuellement, on considère que les ultrasons et l'imagerie optique sont très complémentaires : les ultrasons ont une grande maturité pour rendre compte de l'information morphologique, et l'imagerie optique semble plus efficace pour marquer spécifiquement certains types de tissus (imagerie fonctionnelle). Nous donnerons un exemple de combinaison de ces deux modalités dans le chapitre 5 de la troisième partie.

3.5.5 Positionnement par rapport à l'optoacoustique

Le phénomène optoacoustique permet la détection d'ondes acoustiques émises par un tissu sous l'effet des dilatations thermiques dues à l'absorption d'une onde lumineuse. La reconstruction de l'image est plus simple que dans la TOD car les ondes acoustiques sont peu diffusées par les tissus. Cette méthode permet également de localiser des traceurs absorbants en excitant les tissus à plusieurs longueurs d'onde. Par rapport à la tomographie optique elle offre une meilleure résolution. Des études préliminaires ont montré son intérêt pour de nombreuses applications cliniques, notamment en mammographie [38]. En revanche, l'optoacoustique est actuellement limitée par l'absence d'information a priori sur la fonction d'éclairement des tissus en profondeur. Il paraît donc envisageable d'utiliser la TOD pour dresser la carte des propriétés optiques des tissus et de modéliser la fonction d'éclairement, afin de réaliser une mesure optoacoustique quantitative.

Bilan

Nous avons présenté les modèles de propagation de la lumière dans les tissus vivants et introduit les différentes méthodes optiques permettant de les observer. La tomographie de fluorescence, actuellement très utilisée en préclinique, offre donc de nombreux avantages : faible coût des instruments, taux de contraste élevé et obtention d'une image 3D dans un temps raisonnable. Elle permet aussi d'exploiter l'ensemble des marqueurs fluorescents endogènes ou exogènes de la fenêtre thérapeutique. Enfin, comme elle n'implique pas de rayonnement ionisant, elle permet de réaliser plusieurs examens successifs sur un même animal, réduisant ainsi considérablement le nombre d'animaux nécessaires à l'obtention d'un résultat biologique.

Toutefois, nous allons voir que les tomographes précliniques commercialisés actuellement reposent sur des choix instrumentaux discutables. Les résultats biologiques obtenus avec ces tomographes ne concernent pratiquement jamais les organes les plus absorbants tels que le foie et les poumons, car il est très difficile de faire face à une hétérogénéité importante des tissus.

Nous allons montrer qu'il est possible d'y parvenir en optimisant les éléments d'une chaîne d'acquisition tomographique et en utilisant un algorithme dédié.

Deuxième partie

Un tomographe de fluorescence
continu optimisé pour l'observation
des tissus de faible épaisseur

Introduction (guide de lecture de la partie)

Les systèmes précliniques de tomographie continue existants permettent d'observer en fluorescence des pathologies dans l'abdomen ou le cerveau qui sont des organes dont le coefficient d'absorption est intermédiaire [39, 30, 40]. En revanche, ils donnent peu ou pas de résultats quant il s'agit de pathologies affectant des organes plus absorbants comme le foie ou les poumons par exemple. Pour parvenir à observer le corps entier d'une souris, il est indispensable de pouvoir localiser des inclusions fluorescentes dans ces organes très absorbants. En effet, c'est souvent dans le foie ou les poumons que se disséminent en priorité les métastases issues d'un autre foyer tumoral.

Dans cette deuxième partie, nous allons présenter et mettre en œuvre un tomographe continu capable d'observer des inclusions fluorescentes dans les tissus les plus absorbants de l'animal.

Au cours du chapitre 1, page 38, nous chercherons à déterminer les longueurs d'onde de travail optimales pour traverser les tissus fortement absorbants. Si la notion de fenêtre thérapeutique est bien connue en imagerie *in vivo*, elle apparaît insuffisamment précise dès que l'on vise les organes les plus absorbants de l'animal. En mesurant le spectre de transmission d'une souris, et en tenant compte de l'offre technologique existante, nous définirons les longueurs d'onde de travail optimales, ainsi qu'un ensemble de composants (laser - fluorophore - filtres) permettant de traverser la cage thoracique d'un petit animal.

Dans le chapitre 2, page 47, nous évaluerons les performances de détection requises pour mesurer le signal de fluorescence provenant d'un organe très absorbant. En mesurant le niveau du signal de fluorescence émis par des tumeurs pulmonaires, nous montrerons que les caméras utilisées dans les systèmes existants ont des performances largement surdimensionnées par rapport au signal mesuré. Cette étude nous permettra également d'identifier les caractéristiques d'une caméra adaptée à la mesure tomographique sur petit animal. La caméra que nous utiliserons s'avèrera bien moins onéreuse que celles utilisées par d'autres équipes, tout en demeurant parfaitement adaptée à l'intensité produite par une tumeur pulmonaire.

Le chapitre 3, page 54, montrera comment nous avons fait face à l'hétérogénéité importante des tissus, sans pour autant utiliser de détecteur très performant. L'étude de la dynamique d'un cas biologique réel mettra en évidence cette hétérogénéité du petit animal. Nous montrerons également que le problème de la dynamique apparaît moins dans le contraste de signal au sein d'une même image que dans les différences de signaux d'une image tomographique à l'autre. Pour résoudre ce problème, nous mettrons en œuvre une procédure d'optimisation automatique des temps d'acquisition au niveau du signal d'intérêt et quantifierons son apport en termes de dynamique.

Le chapitre 4, page 60, sera consacré à l'évaluation des performances du tomographe associé à une méthode de reconstruction. Dans un premier temps, il s'agira de déterminer la précision de localisation d'une inclusion fluorescente suivant les trois axes, ainsi que sa capacité à quantifier le fluorophore. Puis, nous montrerons la capacité du système

à quantifier une concentration de fluorophore in vivo dans un cas préclinique concret : l'évolution de tumeurs pulmonaires implantées sur sept souris (suivi longitudinal).

Dans le chapitre 5, page 71, nous évaluerons si le tomographe que nous avons optimisé pour la mesure sur des tissus de faible épaisseur peut être appliqué à des tissus plus épais, tels que les organes humains. La zone balayée par le laser et le champ imagé par la caméra devront être adaptés à l'épaisseur plus grande des tissus. Après avoir déterminé la géométrie d'acquisition optimale pour un cas particulier (mammographie), nous évaluerons la précision de localisation d'une inclusion fluorescente dans un fantôme simulant les propriétés optiques du sein. Ceci nous permettra de conclure sur l'applicabilité à l'homme de la tomographie de fluorescence continue.

Chapitre 1

Quelles longueurs d'onde de travail permettent de minimiser les effets de l'absorption des tissus ?

1.1 Les plages de longueur d'onde proposées par les systèmes existants

Plusieurs équipes de recherche ont développé des dispositifs d'imagerie de fluorescence pour le petit animal basés sur des mesures continues. Ces travaux préliminaires ont donné lieu à huit systèmes commercialisés dont les fonctions sont résumées dans un tableau en annexe, page 146.

Seulement deux de ces systèmes possèdent une fonction de tomographie 3D basée sur une méthode continue [41]. La table 1.1 présente les sources de lumière et le type de filtrage des deux systèmes commercialisés de tomographie continue du petit animal.

Caliper Life Science <i>IVIS Spectrum</i>	Perkin Elmer <i>FMT 2500 LX</i>
Lampe Tungstène 10 filtres d'excitation	4 diodes laser 635,670,745,780 nm
18 filtres d'émission : 340 - 1100 nm	4 filtres d'émission : 650 - 670 nm 690 - 740 nm 770 - 800 nm 805+

TABLE 1.1 – Source de lumière et filtrage des deux systèmes commercialisés de tomographie de fluorescence précliniques [41].

Pour ce qui concerne la source de lumière, les deux systèmes ont des approches radicalement différentes. Le système de Caliper Life Science utilise une lampe à tungstène fibrée. Ce type de lampe dégage beaucoup de chaleur et possède un rendement énergétique très faible (10^{-4} pour une lampe de 150 W) car le filament rayonne dans tout le

spectre visible et infrarouge. La faible cohérence spatiale des lampes limite également le taux de couplage dans la fibre optique. Enfin, les lampes à filament ont une durée de vie courte (2000 heures), ce qui implique l'intervention d'un technicien pour changer la lampe et réaliser le réglage parfois complexe de la position du filament. La durée de vie d'une lampe correspondant au moment où sa puissance a perdu un facteur 2, il n'est pas possible de comparer quantitativement des résultats biologiques obtenus au début et à la fin de la vie de la lampe, à moins de mettre en place un protocole de monitoring contraignant.

Les lasers utilisés par le système de Perkin Elmer ont l'avantage d'avoir une durée de vie bien supérieure à celle des lampes (théoriquement 50 000 heures), un meilleur rendement énergétique, et une finesse spectrale simplifiant considérablement le filtrage. Ils nous semblent donc plus appropriés pour l'application visée. Toutefois, les deux premiers lasers à 635 nm et 670 nm, sont situés à l'extrémité de la fenêtre thérapeutique définie page 8. Ils ne semblent donc pas optimaux pour la traversée des tissus fortement absorbants, ce qui peut avoir pour conséquence un signal de fluorescence faible, voire indétectable devant le signal d'autofluorescence. Le troisième laser à 745 nm semble idéalement situé dans la fenêtre thérapeutique. Toutefois, la technologie des diodes lasers à cette longueur d'onde n'est pas optimale, ce qui a pour conséquence une puissance limitée à 10-20 mW et un encombrement supérieur. La longueur d'onde du dernier laser à 780 nm est optimale sur le plan technologique et demeure dans la fenêtre physiologique. Il ne peut en revanche exciter qu'un nombre de marqueurs limités à ceux dont la longueur d'onde d'émission est supérieure à 800 nm, tels que l'ICG et l'IR Dye.

Enfin, face aux nombreux filtres d'émission disponibles sur ces systèmes, il n'est pas certain que l'utilisateur biologiste sache lequel utiliser pour obtenir la meilleure observation du phénomène qu'il recherche.

Nous allons donc tâcher de déterminer quelle source de lumière et quel fluorophore permettent d'assurer une mesure optimale dans les tissus les plus absorbants.

1.2 Le fluorophore et la source de lumière optimaux pour la mesure dans les organes les plus absorbants de l'animal

1.2.1 Évaluation expérimentale de la « fenêtre thérapeutique » de la souris

Afin de déterminer précisément le couple fluorophore-source de lumière optimaux, nous avons mesuré expérimentalement le spectre d'absorption d'une souris complète. Plusieurs études fournissent les coefficients d'absorption, de diffusion et même d'oxygénation de chaque organe de l'animal pris individuellement [42, 43, 44]. Toutefois, ces articles ne donnent pas de spectre de transmission d'un animal complet, c'est-à-dire incluant toutes les strates successives de tissus (peau, graisse, muscle, organes internes...).

Pour pallier à ce manque, nous avons placé une souris saine en position allongée sur un support transparent, et nous avons placé une fibre optique émettant une lumière

blanche sous ce support. Au-dessus de l'animal, nous avons placé une deuxième fibre reliée à un spectromètre. En déplaçant les fibres au-dessus et au-dessous de différents organes, nous mesurons donc les spectres d'absorption complets. Les résultats, corrigés du spectre de la lampe, sont présentés sur la figure 1.1. Ils sont représentés sous une forme normalisée à 800 nm, car nous ne nous intéressons pas, pour l'instant, à la transmission relative des organes.

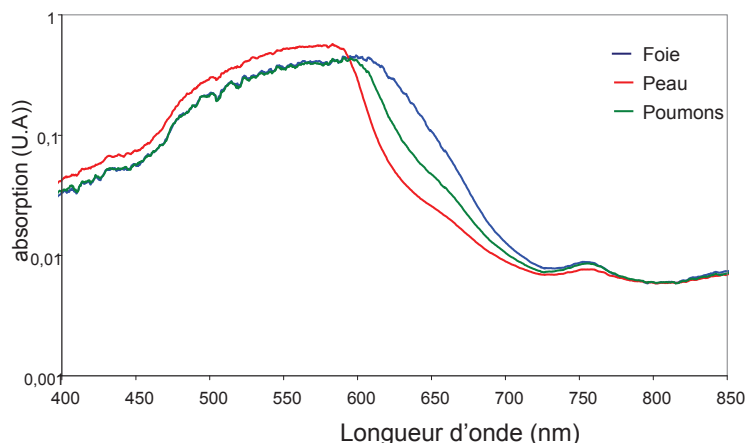


FIGURE 1.1 – Spectres d’absorption d’une souris mesurés à l’aide d’une source blanche et d’un spectromètre fibrés. Les fibres d’excitation et de détection sont placées de manière à intercaler successivement le foie, la peau et la cage thoracique (poumons) de la souris entre les deux fibres.

Nous constatons que les spectres obtenus sur la souris sont très proches des spectres d’absorption de l’hémoglobine (figure 1.2, page 6), ce qui confirme l’hypothèse généralement admise selon laquelle le sang est le principal absorbeur. Nous constatons également que la fenêtre thérapeutique définie entre 700 et 850 nm demeure valable dans le cas d’une lumière traversant la totalité d’un animal. Enfin, l’écart spectral est très faible dans cette fenêtre, alors qu’il est plus important entre 600 et 700 nm.

Nous devons donc choisir un laser et un fluorophore compris dans cette fenêtre pour optimiser l’observation dans les tissus les plus absorbants.

1.2.2 Quelle est la longueur d’onde laser optimale ?

Pour déterminer empiriquement la longueur d’onde laser optimale, nous installons une souris anesthésiée sur un support en verre. A la verticale du centre de la cage thoracique, nous plaçons un capillaire contenant un fluorophore, de concentration représentative du taux de marquage que l’on peut observer sur une tumeur marquée ($5\ \mu\text{l}$ d’une solution concentrée à $0,5\ \mu\text{M}$) [45] .

Nous mesurons le signal de fluorescence généré par quatre lasers : 635, 690, 750 et 800 nm et trois fluorophores : Cy5, Alexa 700 et 750. Ces mesures sont réalisées à l’aide d’une caméra scientifique standard (Hamamatsu Orca-AG) et d’un filtre adapté

au fluorophore considéré. La figure 1.2 permet de comparer les images obtenues pour les longueurs d'onde 635 et 690 nm et les fluorophores Alexa 700 et Cy5.

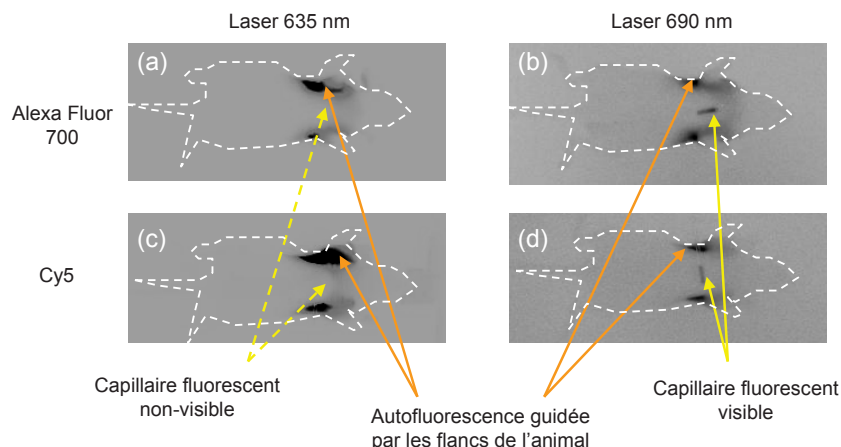


FIGURE 1.2 – (a) Détection d'un capillaire contenant un fluorophore placé au-dessus des poumons de l'animal vivant pour une excitation laser à 635 nm et un fluorophore Alexa Fluor 700. (b) Excitation laser à 690 nm et fluorophore Alexa Fluor 700. (c) Excitation laser à 635 nm et fluorophore Cy5. (d) Excitation laser à 690 nm et fluorophore Cy5. Le signal de part et d'autre du capillaire fluorescent correspond à l'autofluorescence générée sur l'autre face et guidée par la peau.

Nous constatons que le signal provenant des deux fluorophores est détectable à 690 nm mais pas à 635 nm. A 800 nm, bien que le détecteur soit optimisé pour la mesure dans le proche infra-rouge, son rendement quantique n'est plus suffisant pour détecter le fluorophore dans un temps raisonnable.

Entre les longueurs d'onde restantes, 690 et 750 nm, et bien que le laser à 750 traverse aussi bien les tissus que celui de 690 nm, nous retenons 690 nm car la technologie des diodes laser offre un meilleur rapport puissance/encombrement. De plus, le choix d'une basse longueur d'onde permet d'exciter une gamme plus grande de fluorophores. Enfin, le filtrage se trouve simplifié par une longueur d'onde laser éloignée du spectre d'émission.

1.2.3 Quels sont les fluorophores optimaux ?

D'après les chimistes du Laboratoire Fonctionnalisation et Chimie pour les Micro-systèmes (LFCM) du LETI, la contrainte principale des marqueurs situés dans le proche infra-rouge est qu'ils doivent être solubles dans l'eau. Or, plus on va vers l'infra-rouge, et plus on a affaire à des molécules faiblement solubles.

Les principaux fluorophores commercialisés situés dans la fenêtre physiologique et solubles dans l'eau sont les suivants : Cy5.5, FP 681, Cy7, Dylight 680, Atto 680, Dylight 800, Alexa Fluor 680, 700, 750. Nous avons mesuré la fluorescence de ceux pour lesquels nous disposons d'un échantillon, afin de comparer leur spectre d'émission à la courbe

de transmission d'un filtre coloré passe-haut typique (Melles Griot RG9). Le résultat est présenté sur la figure ci-après :

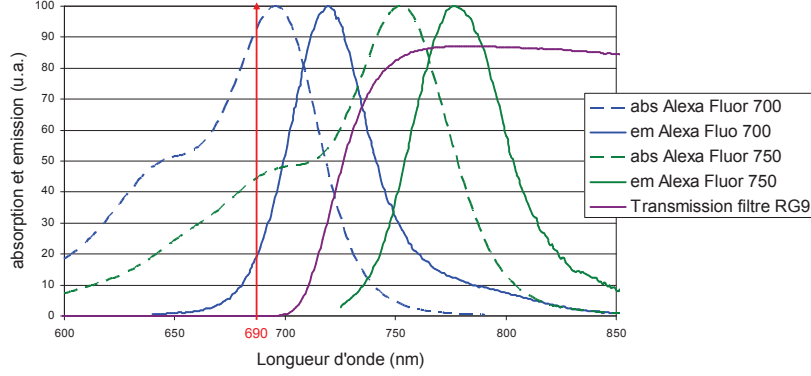


FIGURE 1.3 – Spectre d'absorption et d'émission des deux fluorophores retenus pour la localisation de tumeurs fluorescentes sur le petit animal, et comparaison avec la longueur d'onde du laser ainsi qu'avec la transmission du filtre d'émission. Les spectres sont normalisés par leur maximum.

Tout ces marqueurs pouvant être excités par le laser à 690 nm avec des rendements divers, nous retenons finalement Alexa Fluor 700 et Alexa Fluor 750 dont les spectres sont idéalement situés dans la fenêtre physiologique. De plus, ils sont parfaitement solubles dans l'eau aux concentrations admissibles, et plus stables que les cyanines sur le plan du photoblanchiment. Le critère que nous souhaitons maximiser étant le nombre de photons détectés par la caméra, nous calculons pour chaque fluorophore le produit :

$$I_{abs} \times \eta_{fluo} \times \int_{690\text{ nm}}^{+\infty} I_{em}(\lambda) \times I_{trans\text{ RG9}}(\lambda) \times \eta_{d\acute{e}tecte\text{ur}}(\lambda) d\lambda \quad (1.1)$$

avec I_{abs} et I_{em} désignant respectivement les spectres d'absorption et d'émission normalisés du fluorophore, $I_{trans\text{ RG9}}$ le spectre de transmission du filtre RG9, η_{fluo} le rendement quantique du fluorophore et $\eta_{d\acute{e}tecte\text{ur}}$ celui du détecteur. La table 1.2 montre les différents paramètres intervenant dans le choix du fluorophore optimal :

	Alexa 700	Alexa 750
$I_{abs}(690\text{ nm})$	96 %	46 %
η_{fluo}	25 %	12 %
$\int_{690\text{ nm}}^{+\infty} I_{em}(\lambda) \cdot I_{trans\text{ RG9}}(\lambda) \cdot \eta_{d\acute{e}tecte\text{ur}}(\lambda) d\lambda$	10 %	12,5 %
Produit total	2,4 %	0,7 %

TABLE 1.2 –

Nous retiendrons donc l'Alexa Fluor 700 couplé à la molécule $RAFT - (cRGD)_4$ (présenté sur la figure 3.1, page 25). Nous pouvons également prédire théoriquement

qu'à taux de fixation identique dans les tissus, Alexa 700 produira sur la caméra 3 à 4 fois plus de signal qu'Alexa 750.

1.3 Un dispositif de filtrage optimisé

1.3.1 Deux critères pour déterminer la combinaison de filtres optimale

La longueur d'onde laser et le fluorophore optimaux étant identifiés, nous pouvons déterminer le système de filtrage le plus adapté. Le critère principal que nous avons retenu est le pouvoir d'arrêt du filtre, car nous verrons qu'une part non négligeable de photons venant du laser est guidée par les flancs de la souris et atteint la caméra (figure 2.2 (a), page 50). Pour déterminer précisément le pouvoir d'arrêt de chaque combinaison de filtres d'excitation et d'émission, nous avons multiplié leurs spectres avec celui du laser. L'intégrale du spectre obtenu correspond à la part du signal d'excitation qui parvient à traverser le dispositif de filtrage. Cette simulation nous permet ainsi de tester rapidement l'ensemble des filtres commerciaux disponibles, et de déterminer la combinaison offrant le meilleur pouvoir d'arrêt. La figure 1.4 montre le spectre des filtres finalement retenus : 685AF30 (excitation) et RG9 (émission).

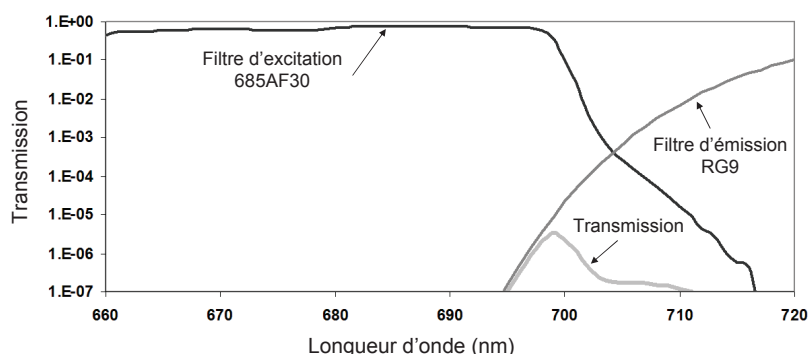


FIGURE 1.4 – Spectres de transmission des filtres d'absorption et d'émission du tomographe et spectre de transmission (fuite laser vers le détecteur) résultant de l'association des filtres.

Nous constatons que la longueur d'onde la plus défavorable est 699 nm car celle pour laquelle la transmission du laser par les filtres est la plus grande. On notera également que le pouvoir d'arrêt des filtres prend une valeur comprise entre 10^{-5} et 10^{-6} à cette longueur d'onde.

L'optimisation du filtrage est également faite suivant un second critère : l'adéquation du spectre de transmission des filtres avec celui d'absorption et d'émission du fluorophore choisi. La comparaison de leurs spectres est présentée sur la figure 1.5.

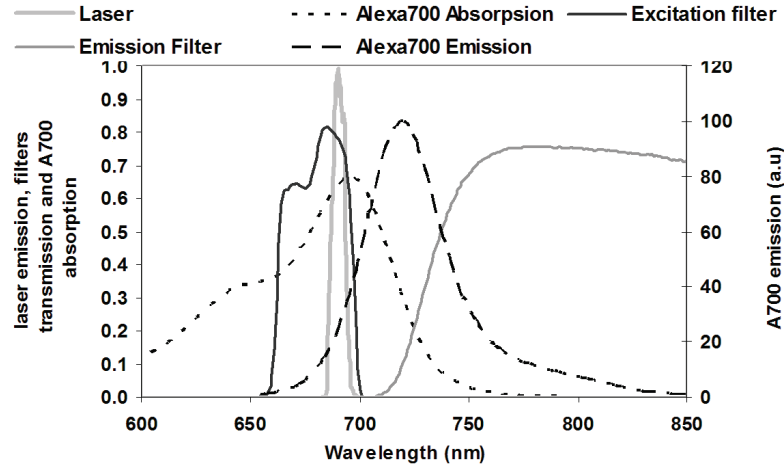


FIGURE 1.5 – Transmission des filtres d’absorption et d’émission du tomographe, spectre du laser, émission et absorption du fluorophore Alexa Fluor 700.

Le spectre de transmission du filtre d’émission peut sembler peu adapté au spectre d’émission du fluorophore, mais la proximité des pics d’excitation et d’émission de celui-ci nous contraint à effectuer ce compromis. Si l’on avait choisi un filtre d’émission plus proche du laser, on aurait observé une fuite de la lumière d’excitation vers le détecteur, ce qui aurait dégradé notre critère de choix principal. De même, si on avait remplacé le filtre d’émission coloré par un filtre interférentiel passe-haut avec un profil plus raide, alors l’inclinaison des photons issus des bords de l’animal n’aurait pas permis au filtre de travailler dans des conditions optimales. Le choix de filtres colorés pour filtrer l’émission nous permet d’obtenir une transmission quasi-identique quel que soit l’angle d’incidence des photons.

1.3.2 Optimisation du spectre de la lumière d’excitation pour améliorer l’efficacité globale du filtrage

Pour réaliser cette optimisation, nous avons agi sur deux paramètres, l’angle d’incidence de la lumière laser sur le filtre d’excitation, et le choix de la diode laser.

Optimisation de l’angle d’incidence du laser sur le filtre d’excitation

L’angle du filtre d’excitation a été optimisé pour maximiser le pouvoir d’arrêt de l’ensemble du système de filtrage. En effet, comme le filtre d’excitation est de type interférentiel, son spectre de transmission varie en fonction de l’angle d’incidence suivant la formule :

$$\lambda_{\theta} = \lambda_0 \sqrt{1 - \left(\frac{n_0}{n} \sin \theta \right)^2} \quad (1.2)$$

avec λ_{θ} désignant la longueur d’onde du pic de transmission pour un angle d’incidence θ , et λ_0 pour une incidence normale. n et n_0 désignent les indices optiques respectifs du matériau constituant le filtre et du milieu extérieur (air). Pour réaliser l’optimisation, on a placé sur le support, à la place de l’animal, une plaque en Téflon

d'épaisseur 5 mm, à la fois diffusante mais très peu fluorescente (d'après notre expérience, le Téflon est le matériau qui fluoresce le moins dans la fenêtre thérapeutique). Le laser illuminant la plaque de Téflon, on acquiert une image avec un temps d'exposition de 10 s. Cette étude étant menée dans l'obscurité complète (à part la diode laser), le seul signal parvenant au détecteur ne peut provenir que de la fluorescence du Téflon (très faible donc) ou d'une transmission de la lumière laser par le système de filtrage. On incline alors progressivement le filtre d'excitation en prenant régulièrement des images, et on observe une diminution du signal détecté par la caméra. Pour chaque inclinaison du filtre, on contrôle également la puissance du laser transmise à travers le filtre. On constate que celle-ci stagne jusqu'à une inclinaison de 10° puis s'effondre car le pic du laser n'est plus dans la fenêtre de transmission du filtre. Cette méthode nous permet de déterminer l'angle d'incidence optimal à 10° . Le gain d'un facteur 3 apporté par l'optimisation de l'angle d'incidence n'est donc pas négligeable.

Optimisation du choix de la diode laser

Nous avons testé trois diodes de même référence. En effet, de légères différences de fabrication entre les diodes entraînent une plage de variation sur la longueur d'onde centrale. Nous avons décidé de tirer parti de cette incertitude pour optimiser le pouvoir de coupure du système de filtrage. On a vu que c'est à 699 nm que les fuites laser sont les plus importantes. Nous avons donc choisi, parmi les 3 modèles donc nous disposions, la diode laser dont le spectre était le plus porté vers les basses longueurs d'onde, de manière à accroître la puissance mesurée en sortie du filtre d'excitation, et à diminuer l'intensité des fuites dans le système de filtrage. Pour cela, nous avons comparé la puissance mesurée à la sortie du filtre d'excitation (incliné de 30°) pour chacune des 3 diodes laser, et nous avons retenu la diode offrant la plus forte puissance (19,6 mW). Une mesure du spectre de ces diodes nous a confirmé que la diode retenue était celle dont le pic d'émission avait la longueur d'onde moyenne la plus basse.

Il aurait également été possible de décaler la longueur d'onde du laser en modifiant la température de régulation. Nous n'avons pas mis en oeuvre cette deuxième solution en raison de sa complexité.

Bilan du chapitre 1

Par rapport aux systèmes existants, l'intérêt de notre approche réside dans le fait qu'elle propose au biologiste un ensemble source-fluorophore-filtre unique et optimisé pour la mesure dans des organes absorbants.

Le choix d'une diode laser compacte à 690 nm résulte d'un compromis entre la transmission dans les tissus et l'offre technologique. Ce choix se rapproche plus de celui du système de Perkin Elmer (laser à 670 nm) que de celui de Caliper Lifescience (lampe). Contrairement à ces systèmes généralistes, nous avons cherché à déterminer le fluorophore permettant de maximiser le signal détecté. Nous avons pu montrer notamment que le choix d'Alexa Fluor 700 permet de tripler le signal détecté par rapport à Alexa Fluor 750.

Nous devons à présent déterminer les performances de détection requises pour l'exploitation optimale d'un signal issu d'acquisitions tomographiques. Les deux critères que nous chercherons à maximiser sont la sensibilité et la dynamique de mesure. La sensibilité conditionne en effet la capacité du système à mesurer les signaux faibles qui proviennent des tissus les plus absorbants. La dynamique permet au système de gérer les hétérogénéités importantes des tissus.

Chapitre 2

Les performances de détection requises pour l'observation dans des tissus très absorbants

2.1 La sensibilité et la dynamique des systèmes existants

Les deux systèmes existants de tomographie précliniques continus sont basés sur des caméras haut de gamme [41], refroidies de -70 à -90°C et disposant d'un convertisseur analogique numérique de 16 bits, ce qui permet théoriquement de distinguer 65536 niveaux de fluorescence (voir ci-après) :

Caliper Life Science <i>IVIS Spectrum</i>	Perkin Elmer <i>FMT 2500 LX</i>
CCD refroidie à -90°C 16 bits 1 Megapixel, 13 μm	CCD refroidie à -70 - 80°C 16 bits
champ réglable de 4×4 à $25 \times 25 \text{ cm}^2$	champ fixe $5 \times 5 \text{ cm}^2$

TABLE 2.1 – Caractéristiques de la caméra et de l'optique des deux systèmes précliniques de tomographie de fluorescence continue [41].

Le refroidissement d'un capteur permet principalement de diminuer le *courant d'obscurité*, ainsi que le *bruit d'obscurité* qui lui est associé. Or, ces deux phénomènes augmentent linéairement avec le temps d'exposition puisqu'il s'agit d'un effet d'accumulation des charges dans les pixels. On peut donc se demander si le refroidissement de ces systèmes est adapté à l'observation de signaux de fluorescence. Par exemple, le système de Perkin Elmer, prétend réaliser un balayage complet de l'animal en deux à quatre minutes, ce qui implique des temps d'exposition de 0,5 s pour 500 images. On peut donc se demander s'il est rationnel de refroidir un capteur à -90°C pour réaliser une image de 500 ms de temps d'intégration.

Les caméras utilisées dans ces systèmes possèdent également un grand nombre de pixels, ce qui n'est pas très utile car les tissus agissent comme un filtre passe-bas [46] pour les fréquences spatiales. Un objet ponctuel situé au milieu d'un animal génère une tache lumineuse de plusieurs millimètres de rayon à la surface de l'animal. De plus, la quantité d'information que peuvent traiter les algorithmes de reconstruction étant limitée, ceux-ci utilisent comme valeurs d'entrée des sommes de pixel adjacents (« binning »), ce qui rend inutile, voire contre-productive l'utilisation d'une caméra possédant une grande densité de pixels. Ces caméras, en effet, ont un coefficient de remplissage moins élevé et un bruit de lecture plus important que les caméras à gros pixels.

La dynamique élevée de ces systèmes (typiquement 16 bits) semble à première vue appropriée à l'imagerie tomographique, car les images obtenues sont fortement contrastées comme nous le montrerons (cf. figure 2.2, page 50). Toutefois, on peut se demander si une caméra de dynamique inférieure ne serait pas parvenue à un niveau de quantification du signal aussi satisfaisant.

En résumé, les détecteurs utilisés dans les systèmes commercialisés semblent donc avoir été choisis selon le principe du « qui peut le plus peut le moins », et non pas en fonction des caractéristiques du signal à mesurer. Ils n'ont pas non plus été sélectionnés dans une optique de maîtrise des coûts.

Pour choisir le détecteur optimal, nous préférons privilégier une approche consistant à évaluer expérimentalement la sensibilité, la dynamique et la densité de pixels requis pour la mesure en tomographie de fluorescence. Pour y parvenir, nous allons analyser les caractéristiques (intensité et dynamique) d'un signal de fluorescence provenant d'un cas biologique réel.

2.2 L'analyse de signaux biologiques réels

2.2.1 Protocole de mesure et dispositif expérimental

Pour réaliser cette étude, nous avons suivi sur une souris l'évolution de tumeurs 10 et 14 jours après l'injection de cellules initiatrices de cancer du sein, mais se fixant et croissant en priorité dans les poumons. Ces cellules sont de type adénome TSA (Tumor Specific Antigen). Le marquage est réalisé en injectant 10 nmoles de $\text{RAFT} - \text{c(RGD)}_4 - \text{Alexa700}$, marqueur spécifique de l'intégrine $\alpha_V\beta_3$ décrit page 24. Trois heures après l'injection, la souris est anesthésiée par voie gazeuse et placée sur le dispositif expérimental représenté sur la figure suivante :

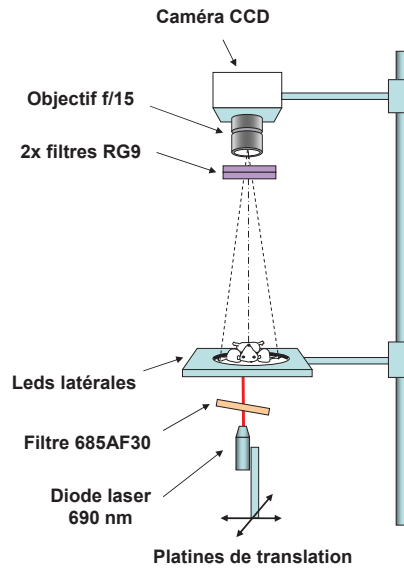


FIGURE 2.1 – Dispositif expérimental destiné à réaliser une acquisition de signal de fluorescence provenant de la cage thoracique de l’animal.

Ce dispositif est basé sur les éléments optimaux (laser, filtres et fluorophore) que nous avons déterminés au chapitre 1. La lumière de la diode laser (35 mW, 690 nm) est focalisée sous la souris suivant un diamètre (waist) de 100 μm . Pour mesurer le signal de fluorescence, nous ajoutons à une distance de 35 cm de l’animal un objectif f/15 (Schneider Kreuznach) et une caméra de dynamique 12 bits (Hamamatsu Orca ER).

A l’aide de deux platines de translation motorisées, nous positionnons le laser à la verticale du centre de la cage thoracique de l’animal, afin d’illuminer la région pulmonaire.

2.2.2 Niveau de signal et dynamique d’une acquisition typique dans la cage thoracique

Dans les deux cas observés (10 jours et 14 jours après l’injection des tumeurs), on mesure sur les images le profil du signal de fluorescence le long d’une ligne traversant les deux poumons de la souris (figure 2.2).

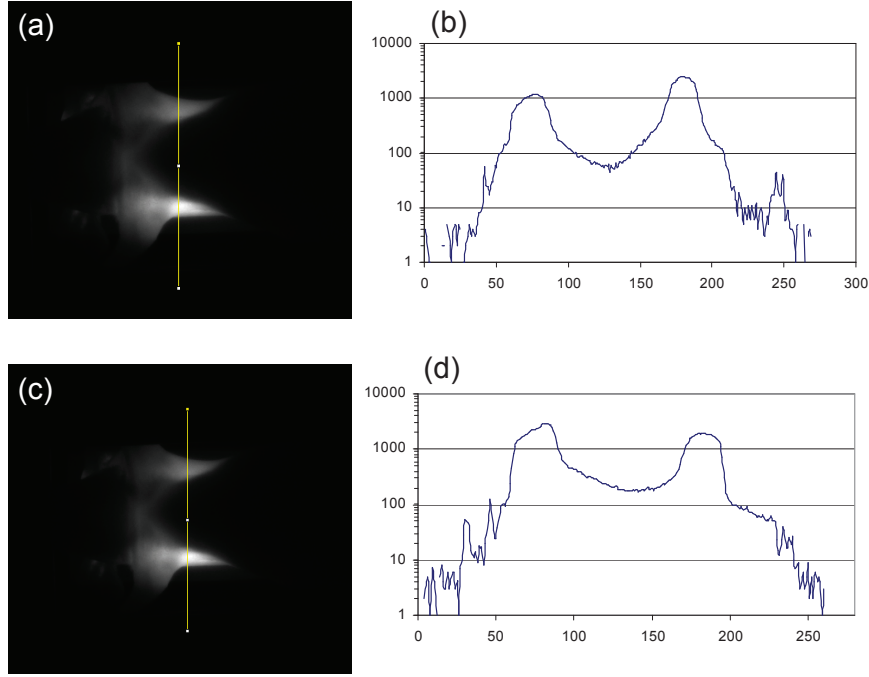


FIGURE 2.2 – (a,b) : image et profil du signal de fluorescence obtenus au dixième jour d'évolution de la maladie avec un temps d'exposition de 1,3 s. (c,d) : image et profil du signal de fluorescence obtenus au quatorzième jour d'évolution de la maladie avec un temps d'exposition de 370 ms.

Nous constatons que, dans le cas de la souris au dixième jour, l'intensité du signal de fluorescence au centre de la zone pulmonaire vaut 50 niveaux pour une image acquise en 1,3 s. Au quatorzième jour, le niveau de gris mesuré au même point vaut 200 ± 10 pendant un temps d'exposition de 370 ms. Ces mesures nous permettent d'estimer le signal émis par la zone pulmonaire marquée en début de maladie à $50 \text{ niveaux} \cdot \text{s}^{-1}$ contre $540 \text{ niveaux} \cdot \text{s}^{-1}$ à la fin de celle-ci. Le niveau de signal mesuré a donc été multiplié par 10 entre le début et l'état de la maladie après 4 jours.

Dans la zone pulmonaire, on constate qu'il y a un écart de $3000 - 50 = 2950$ entre le niveau de gris maximal et minimal, soit une dynamique proche de 3000 dans une même acquisition.

Connaissant désormais le flux du signal fluorescent provenant des tumeurs pulmonaires, nous allons démontrer que la caméra utilisée sur le dispositif expérimental possède une sensibilité et une dynamique adaptées.

2.2.3 Sensibilité et dynamique du système sur la plage de signal d'intérêt

Pour démontrer que la sensibilité de la caméra est adaptée au signal mesuré dans les poumons, nous devons prouver que l'incertitude qu'elle introduit dans la mesure est négligeable devant le bruit photonique. La caméra n'étant pas la seule source de bruit,

nous allons quantifier l'incertitude engendrée par tous les composants de la chaîne d'instrumentation. Ce bilan photométrique nous permettra de comparer les sources d'incertitude et de montrer qu'elles sont toutes négligeables devant le bruit photonique, pour les plages de signal provenant des poumons.

Le signal M mesuré par un pixel peut s'écrire :

$$M = N_{laser} \cdot T_{filtres} \cdot X \cdot E_{collection} \cdot \eta \cdot G \quad (2.1)$$

avec N_{laser} désignant le nombre de photons émis par le laser, $T_{filtres}$ le produit des coefficients de transmission des filtres, X la transmission dans le milieu (incluant le rendement de fluorescence), $E_{collection}$ l'efficacité de collection de l'objectif, η le rendement quantique de la caméra, et G le gain électronique.

En présence de fluctuations sur le laser, de bruit photonique au niveau de la conversion photons vers électrons, et de bruit de lecture, l'équation 2.1 devient :

$$M = [(N_{laser} + \delta N_{laser}) T_{filtres} \cdot X \cdot E_{collection} \cdot \eta + \delta N_{photonique}] \cdot G + \delta M_{lecture} \quad (2.2)$$

avec δN_{laser} désignant les fluctuations du laser, $\delta N_{photonique}$ le bruit photonique, et $\delta M_{lecture}$ le bruit de lecture de la caméra.

A l'aide de la formule de propagation des incertitudes, la variance de M peut s'écrire :

$$Var(M) = \left(\frac{\partial M}{\partial N_{laser}} \right)^2 Var(N_{laser}) + \left(\frac{\partial M}{\partial N} \right)^2 Var(N) + \left(\frac{\partial M}{\partial M_{lecture}} \right)^2 Var(M_{lecture}) \quad (2.3)$$

avec N le nombre de photons détectés par la caméra.

Sa fluctuation étant due au bruit photonique, on a $Var(N) = N = M/G$. Ceci conduit, après simplification, à l'équation :

$$Var(M) = M^2 \cdot \frac{Var(N_{laser})}{N_{laser}^2} + G \cdot M + Var(M_{lecture}) \quad (2.4)$$

Pour quantifier $Var(N_{laser})$ nous mesurons les fluctuations du laser après une période de chauffe de 30 minutes (voir figure ci-après) :

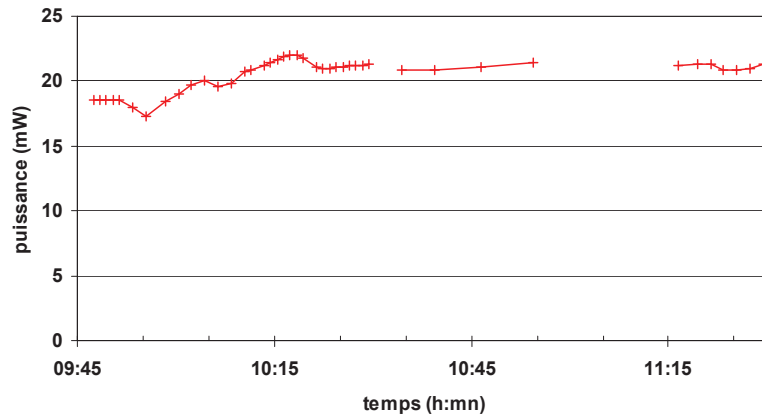


FIGURE 2.3 – Evolution de la puissance laser au cours du temps.

Nous estimons l'écart type sur la puissance du laser à 0,16 mW pour une puissance moyenne de 21 mW, soit 4.10^{24} photons.s⁻¹.

Pour estimer l'efficacité de collection de l'objectif, nous faisons le rapport entre la surface de la pupille et celle de la demi-sphère dont le rayon correspond à la distance de travail. Nous obtenons ainsi $E_{collection} = 6,4.10^{-4}$. Enfin, le gain $G = 0,24$ niveau/electron et le bruit de lecture dont la variance est estimée à 3,2 niveaux sont obtenus en caractérisant la caméra (cf. annexes page 147).

La figure 2.4, obtenue en prenant la racine carrée de l'équation 2.4, montre l'influence des fluctuations du laser, du bruit photonique et du bruit de lecture sur l'écart type de la mesure :

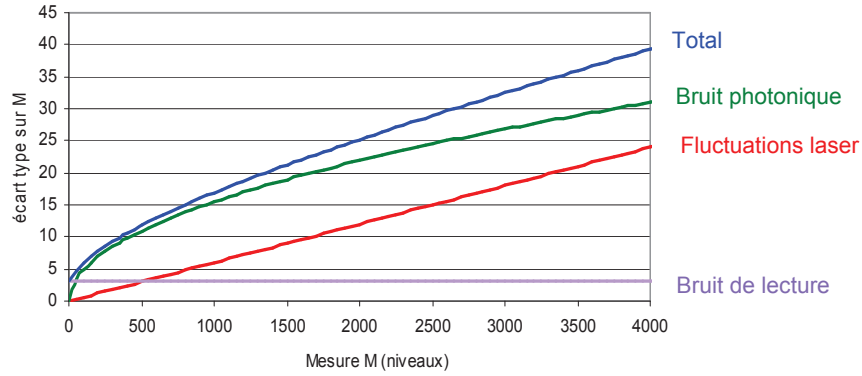


FIGURE 2.4 – Contribution des différentes sources de bruit à l'incertitude du signal mesuré (écart type).

On constate que bien que l'influence des fluctuations du laser sur la variance totale varie en M^2 , cette source d'incertitude reste inférieure au bruit photonique sur toute la dynamique de la caméra. Le bruit de lecture de la caméra demeure donc négligeable dans tous les cas.

Bilan du chapitre 2

Cette étude photométrique a mis en évidence que la tomographie continue n'impose pas d'utiliser une caméra très performante. Avec une caméra dont les performances sont inférieures à celles utilisées par d'autres équipes, nous avons montré que *bruit photonique* est majoritaire dans la plupart des observations. Nous avons également montré qu'une dynamique de mesure de 12 bits était suffisante pour quantifier le signal sans ajouter d'incertitude.

Ce résultat peut être mis en perspective avec les travaux récents d'une équipe de Zurich qui a utilisé un capteur CMOS, pourtant très bruité, pour faire de la tomographie continue de fluorescence dans un IRM [47].

Les *fluctuations du laser* sont, après le bruit photonique, la deuxième source d'incertitude. Une amélioration possible du système pourrait consister à utiliser un laser

stabilisé en puissance, ou à monitorer sa puissance au cours de l'acquisition tomographique.

La sensibilité du tomographe est donc limitée par le bruit photonique. Comme celui-ci diminue (en relatif) avec le nombre de photons collectés, le seul moyen de l'améliorer consiste à accroître la proportion de photons collectés.

Or, de tous les éléments du système optique, c'est l'ouverture de l'objectif qui constitue le facteur principal de perte de signal (fraction de photons collectés : $6,4 \cdot 10^{-4}$). Cette perte est évidemment à relativiser par rapport à l'absorption par le milieu biologique (fraction de photons transmis par les tissus : $6,7 \cdot 10^{-9}$). Il n'en demeure pas moins qu'il devrait être possible d'améliorer la sensibilité du dispositif en réduisant la distance de travail.

Toutefois, pour obtenir une image 3D, une acquisition unique ne suffit pas : le système doit réaliser une succession d'acquisitions en balayant le laser sous l'animal. Nous allons donc être amenés à gérer des niveaux d'absorption différents en fonction des différents organes de l'animal.

La dynamique très élevée des caméras utilisées dans les systèmes existants est-elle indispensable pour prendre en compte cette hétérogénéité ? Dans le prochain chapitre, nous traiterons cette problématique en proposant une procédure d'acquisition permettant de s'affranchir d'une dynamique de détection élevée.

Chapitre 3

Quels moyens instrumentaux pour faire face à l'hétérogénéité des tissus ?

3.1 Évaluation de la transmission relative des différents organes d'un animal

Avant de proposer un protocole permettant d'adapter la dynamique de mesure au signal, nous allons *quantifier les différences d'absorption* à l'intérieur d'un petit animal. Pour cela, nous mesurons l'absorption des principaux organes d'une souris saine après dissection. Les organes de la souris sont placés dans des cuvettes, broyés et dilués pour nous affranchir des effets de la diffusion. Ils sont ensuite placés dans un spectromètre d'absorption réglé à 690 nm. La figure 3.1 montre la plage de variation de la transmission des organes de la souris, corrigée en fonction du facteur de dilution et de l'épaisseur de la cuvette selon la loi de Beer-Lambert.

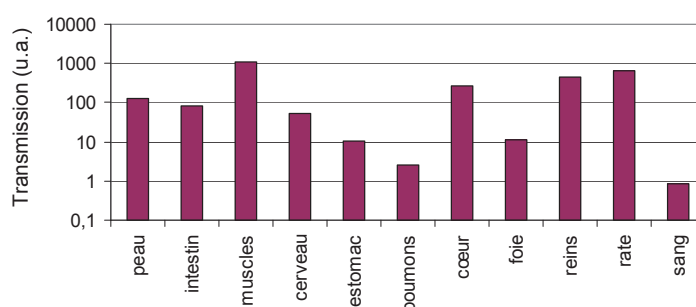


FIGURE 3.1 – Comparaison de la transmission des organes d'une souris saine exprimée en échelle logarithmique (unités arbitraires).

Cette étude confirme l'idée selon laquelle la transmission des tissus du petit animal est fortement hétérogène et permet de préciser la gamme de variation de signal que l'on peut s'attendre à détecter. En moyenne, on peut considérer que la transmission d'un organe par rapport à l'autre varie d'un facteur 10 autour de la valeur moyenne (jusqu'à 10 fois plus ou 10 fois moins que la transmission moyenne). L'écart maximum

correspond à deux ordres de grandeur, par exemple entre les poumons et les muscles. Il est intéressant de remarquer que ces résultats, bien qu'obtenus à l'aide d'un protocole de mesure très différent, sont en accord avec ceux obtenus par Alexandrakis [43] (la référence actuelle) et ceux, plus anciens, de Brown et al. [42]. Le seul écart important entre notre mesure et celle d'Alexandrakis concerne les poumons, dont nous surestimons l'absorption en raison du broyage de l'organe, qui diminue son volume pour une teneur en hémoglobine identique. Il n'en demeure pas moins que les poumons constituent le deuxième organe le plus absorbant de l'animal, ce qui valide les choix de cas biologiques étudiés dans cette partie (pages 49, et 67).

3.2 Méthodes couramment employées pour calculer le temps d'exposition optimal

Les articles décrivant les systèmes de tomographie existants [40, 30] ne précisent pas la méthodologie utilisée pour faire face à ces importantes différences de signal sur le plan instrumental. Sur celui de la reconstruction, en revanche, au moins deux méthodes de prise en compte des hétérogénéités ont été décrites en détail [48, 49].

Les systèmes existants sont basés sur une caméra dont la dynamique permet une quantification théorique sur 65536 niveaux. Nous avons vu que cette dynamique était surdimensionnée par rapport à un cas biologique dont la dynamique de signal est proche de 3000.

Toutefois, au cours du balayage par le laser, on peut être amené à mesurer des différences de signaux plus importantes que nous allons quantifier (voir page 57).

Une technique courante en photographie consiste à adapter le temps d'exposition à la luminosité de la scène. La méthode de calcul du temps d'exposition optimal, appelée « metering mode », se base sur la mesure du niveau de gris moyen d'une partie restreinte du champ de vision à l'aide d'un photomètre. L'électronique embarquée calcule alors le temps d'exposition optimal pour obtenir un niveau de gris moyen de référence (constitué de 82% de blanc et de 18% de noir) [50].

Cette technique n'est pas satisfaisante pour notre application car elle conduit à l'apparition de nombreux pixels saturés sur l'image « optimisée ». Des essais de reconstruction que nous avons menés à partir d'images saturées ont montré l'apparition de nombreux artefacts gênant l'interprétation biologique du résultat.

Ce problème se produit également en photographie pour les images prises en contre-jour, ou durant la nuit. Pour pallier à cela, certains photographes utilisent la technique du « bracketing » qui consiste à prendre une série de photographies successives en un seul déclenchement, la durée d'exposition variant automatiquement entre les prises de vue. Ces images peuvent être ensuite combinées avec un logiciel de retouche, afin de masquer les zones saturées d'une image par les mêmes zones issues d'une image moins exposée.

Le « bracketing » pourrait être utilisé dans notre application pour construire une image de très haute dynamique, en corrigeant le niveau de gris de chaque pixel de son temps d'exposition. Toutefois, les différents temps d'exposition utilisés étant arbitraires, cette technique ne nous met pas à l'abri de l'apparition de pixels saturés.

Pour résoudre ce problème nous avons implémenté *une méthodologie itérative permettant de calculer le temps d'exposition optimal tout en garantissant l'absence de pixels saturés* sur l'image finale.

3.2.1 Méthode de calcul itérative du temps d'exposition optimal

La procédure de calcul du temps d'exposition optimal que nous avons implémentée sur le tomographe est présentée sur la figure 3.2 :

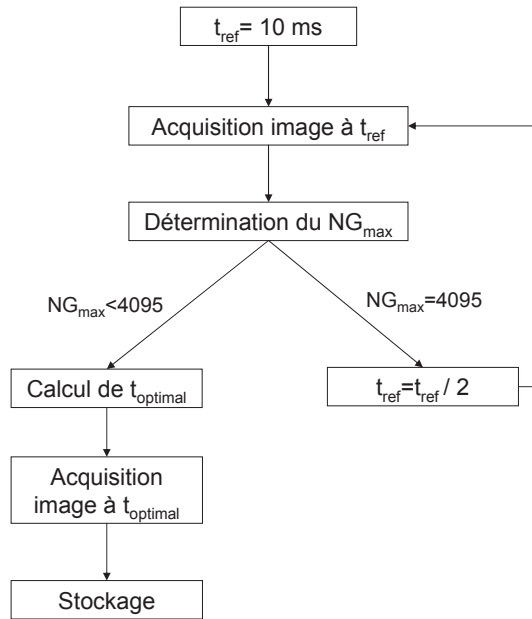


FIGURE 3.2 – Procédure permettant de déterminer le temps d'exposition optimal.

Pour chaque position du laser, on acquiert une première image avec un temps d'exposition très court fixé arbitrairement (10 ms). Sur cette image, le logiciel estime le signal maximum sur une région d'intérêt correspondant à la zone qui sera balayée par le laser au cours de l'acquisition tomographique et étendue de 50 pixels sur chacun de ses côtés.

Puis, le logiciel calcule le temps d'exposition optimal, en appliquant la formule suivante :

$$t_{optimal} = \frac{(3800 - M_{noir}) \times 10}{M_{max} - M_{noir}} \quad (3.1)$$

avec $t_{optimal}$ désignant le temps d'exposition optimal exprimé en ms, M_{noir} le niveau moyen mesuré sur une image de noir, et M_{max} le niveau maximal mesuré sur une région d'intérêt de l'image acquise avec un temps d'exposition de 10 ms.

A l'aide de ce temps d'exposition optimal, le logiciel acquiert alors une nouvelle image qui devrait avoir un niveau de gris maximal de $3800 + M_{noir}$, ce qui est proche de la dynamique maximum de la caméra.

Nous avons choisi de limiter la dynamique de mesure à 3 800 plutôt qu'à 4 095 pour éviter que le bruit photonique n'engendre des pixels saturés. Par exemple, si un niveau de gris correspond à 4 électrons (voir la caractérisation du gain électronique page 148), 4 000 niveaux correspondent à 16 000 électrons, dont le bruit correspondant s'élève à $\sqrt{16\,000} = 127$ électrons, soit $127/4 = 32$ niveaux. La marge de sécurité correspond ainsi à 6 écarts types, ce qui assure une probabilité extrêmement faible d'occurrence d'image saturée.

Il peut arriver, au cours du balayage du laser, que l'image initiale de 10 ms soit elle-même saturée. Dans ce cas, on ne peut plus utiliser la formule 3.1 car la relation entre le niveau de gris maximum de la région d'intérêt et le temps d'exposition n'est plus proportionnelle.

Dans cette situation, le logiciel prend une nouvelle image avec un temps d'exposition deux fois moindre (5 ms). Si l'image est toujours saturée, il divise à nouveau par deux (2,5 ms) et ainsi de suite jusqu'à obtenir une image non saturée. Une fois que celle-ci est obtenue, le logiciel peut alors calculer le temps d'exposition optimal à l'aide de la formule 3.1, modifiée en remplaçant « 10 » par la dernière valeur du temps d'exposition. Cette méthode dichotomique converge rapidement vers l'obtention d'une image non saturée. Étant donné que les images préliminaires ne sont pas stockées sur le disque et que les temps d'exposition sont très courts, cela permet de calculer le temps d'exposition rapidement, en moins de 100 ms. Il n'y a donc pas d'impact significatif sur la durée globale d'acquisition.

3.2.2 Efficacité de la méthode du calcul du temps d'exposition optimal sur un cas biologique

Nous allons évaluer l'apport du calcul du temps d'exposition optimal sur la dynamique de mesure de l'ensemble de la pile d'images obtenue au cours du balayage laser. La figure 3.3 montre l'histogramme des temps d'exposition optimaux utilisés pour les différentes acquisitions d'un balayage laser de 11×11 positions avec un pas de 2 mm, centré sur les poumons de la souris porteuse de tumeur décrite page 49.

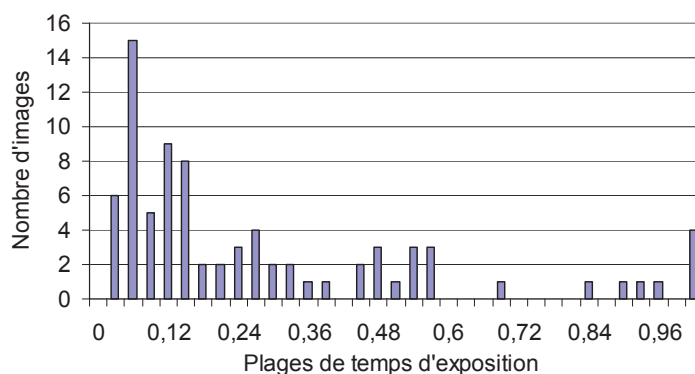


FIGURE 3.3 – Histogramme des temps d'exposition optimaux utilisés durant un balayage tomographique de la zone pulmonaire d'une souris, au dixième jour après l'inoculation des tumeurs. En ordonnée figure le nombre d'images ayant un temps d'exposition compris dans chaque intervalle temporel.

Le plus court des temps d'exposition optimaux vaut 10 ms, et le plus élevé 1,3 s (ce dernier n'est pas représenté sur la figure 3.3 pour éviter une dilatation excessive de l'échelle). *La procédure d'optimisation des temps d'exposition a donc permis d'améliorer la dynamique de mesure sur l'ensemble de l'acquisition tomographique d'un facteur 130.* On remarque que ce facteur est du même ordre de grandeur que les variations d'absorption des organes de la souris estimées à la page 54.

On notera cependant qu'en raison de la non-linéarité de la caméra au-dessous de 1 ms, nous avons imposé une borne inférieure au temps d'exposition optimal (1 ms). Le temps calculé peut être inférieur à 1 ms lorsque le faisceau laser pointe en dehors de l'animal, et atteint directement la caméra. Dans ce cas, la saturation ne gêne pas la reconstruction parce qu'elle est en dehors de la zone d'intérêt. Il y a néanmoins un problème d'aveuglement (« blooming ») de la caméra (fuite des électrons provenant des pixels saturés vers les pixels adjacents). Pour corriger cela, nous avons ajouté au logiciel une procédure de détection des images saturées afin que celles-ci ne soient pas prises en compte lors de la reconstruction.

Bilan du chapitre 3

Nous avons donc déterminé les longueurs d'onde de la source de lumière, du fluorophore, et le filtrage optimaux pour l'observation d'un signal fluorescent provenant des organes les plus absorbants de l'animal. Nous avons également montré qu'une caméra de performances moyennes et faiblement refroidie était parfaitement adaptée à cette mesure, puisque sa contribution à l'incertitude de mesure est inférieure au bruit photonique. Enfin, pour gérer au mieux l'hétérogénéité des tissus, nous avons mis en place une procédure de calcul automatique des temps d'exposition qui a permis d'accroître la dynamique de mesure initiale d'un facteur 130.

Pourtant, le système n'est évidemment pas capable à lui seul de remonter à la carte 3D de fluorescence dans ces organes. Nous devons donc montrer que la localisation d'inclusions fluorescentes demeure possible lorsque le système est associée à une méthode de reconstruction.

Chapitre 4

Évaluation des performances du système associé à une méthode de reconstruction

4.1 Une méthode de reconstruction contribuant à la prise en compte des hétérogénéités d'absorption

La méthode utilisée pour reconstruire la carte 3D de fluorescence a été développée au laboratoire LISA par Lionel Hervé et Anne Koenig. Cette méthode a été décrite en détail dans les références [49, 45]. Nous allons donc simplement résumer son principe.

La propagation du flux d'énergie diffusé dans un milieu homogène suit l'équation de Helmholtz (voir eq. 2.15, page 16). Dans le cas d'un milieu hétérogène, cette équation prend la forme suivante :

$$\Delta\phi(\vec{r}) - k^2(\vec{r})\phi(\vec{r}) = -\lambda\delta_S(\vec{r}) \quad (4.1)$$

avec $k^2(\vec{r}) = 3\mu_a(\vec{r})\mu'_s(\vec{r})$ représentant une « carte des hétérogénéités optiques » qui permet de prendre en compte de manière globale la différence d'atténuation et de diffusion en fonction de la position. Cette formulation introduit également le coefficient λ qui dépend de l'intensité du laser, de la sensibilité du détecteur et de l'efficacité des filtres et doit être calibré sur une expérience de référence (sur un fantôme de propriétés optiques connues par exemple). Cette équation est complétée par les conditions de bord extrapolées décrites en référence [51]. Une forme discrète de l'équation de Helmholtz est obtenue par une méthode de volumes finis appliquée sur un maillage adapté aux conditions de bord extrapolées [45].

La reconstruction est effectuée en deux étapes : dans un premier temps, on calcule la carte d'atténuation $k(\vec{r})$ en comparant les images de diffusion au modèle direct des fonctions de Green de manière itérative ; puis, on reconstruit la carte de fluorescence à partir des images de fluorescence, à l'aide d'une méthode de minimisation de type « Algebraic Reconstruction Technique » (ART). L'algorithme converge au bout de 15 itérations avec un paramètre de relaxation de 0,1.

Cette méthode est adaptée à une géométrie quelconque. Elle nécessite cependant de connaître les contours de l'animal. Cette connaissance a priori est obtenue en mesurant la déformation d'une ligne laser balayant l'animal suivant un axe. Cette méthode est couramment utilisée en contrôle qualité pour mesurer la hauteur d'objets en défilement. Toutefois, elle requiert généralement l'ajout d'une caméra dédiée placée à 90° de l'axe du laser.

Pour simplifier le dispositif, nous avons développé une méthode originale utilisant la caméra principale du tomographe pour mesurer la déformation de la ligne laser. Comme la caméra n'est pas située à 90° de l'axe du laser, les mesures doivent être corrigées d'un coefficient dépendant de la configuration géométrique du tomographe et de la position de la ligne laser. La description détaillée du dispositif de mesure et de la méthode de correction figure en annexe 3, page 154.

4.2 Évaluation de la résolution du tomographe

4.2.1 Résolution des systèmes existants

La résolution en tomographie optique n'est pas comparable à celle dont on parle généralement au sujet des systèmes d'imagerie, mesurée en paires de lignes par millimètres. La résolution des systèmes d'imagerie est basée sur l'optique géométrique et le calcul de la tâche de diffraction. Elle dépend principalement de la densité de pixels et de l'ouverture de l'objectif. En tomographie au contraire, le milieu observé étant fortement diffusant, les calculs d'optique géométrique ne s'appliquent pas et la résolution de localisation d'une inclusion doit être considérée au travers de toute la chaîne d'instrumentation (balayage du laser, détection), mais aussi de la méthodologie de reconstruction.

Les spécifications des systèmes commercialisés ne s'engagent pas sur une précision de localisation de l'inclusion. Une seule publication, concernant l'appareil de Perkin Elmer évoque une résolution « millimétrique dans le plan du balayage laser (plan X,Y) » [52]. Toutefois, cet article ne donne pas de valeur précise, en particulier suivant l'axe Z qui est pourtant celui de moins bonne résolution. Cette publication n'évoque pas la perturbation que pourrait provoquer la proximité d'une zone plus absorbante.

Avant de déterminer quelle est la résolution dans le plan (X,Y), mais aussi en Z que l'on peut atteindre en tomographie continue, il convient de mettre en place un protocole permettant de l'évaluer objectivement. Ensuite, il faut identifier les paramètres qui l'influencent. On peut alors déterminer les valeurs optimales de ces paramètres pour la résolution.

4.2.2 Évaluation de la résolution dans le plan X,Y dans un fantôme hétérogène

Pour évaluer la résolution en X,Y du tomographe, nous réalisons une acquisition d'images tomographiques, sur un fantôme solide simulant la présence de trois inclusions fluorescentes situées au dessus d'une zone dix fois plus absorbante que le milieu

environnant. Cette zone plus absorbante simule la présence d'un organe présentant par exemple une forte vascularisation (voir page 54). Le fantôme est constitué d'un mélange de résine époxy, d'encre et d'oxyde de titane pour simuler respectivement un coefficient d'absorption $\mu_a = 0,2 \text{ cm}^{-1}$ et de diffusion $\mu'_s = 10 \text{ cm}^{-1}$ à 700 nm. Dans ce fantôme, un trou de 8 mm de diamètre est rempli d'un mélange d'encre et d'intralipide de manière à obtenir dans cette zone $\mu_a = 2,2 \text{ cm}^{-1}$ et $\mu'_s = 10 \text{ cm}^{-1}$. On place ensuite trois inclusions fluorescentes constituées de capillaires contenant 5 μl d'Alexa Fluor 700 à 1 μM , situées à une distance respective de 3 et 4 mm de centre à centre (figure 4.1 (a)). Après un balayage de 10 x 10 positions du laser avec un pas de 2 mm durant lequel on acquiert les images de diffusion et de fluorescence, on utilise la méthode décrite page 60 pour reconstruire la carte 3D des coefficients k^2 (figure 4.1 (b)). Les figures 4.1 (c) et (d) représentent la carte de fluorescence obtenue sans (c) et avec absorbeur (d), de façon à montrer la perturbation que celui-ci entraîne sur la reconstruction.

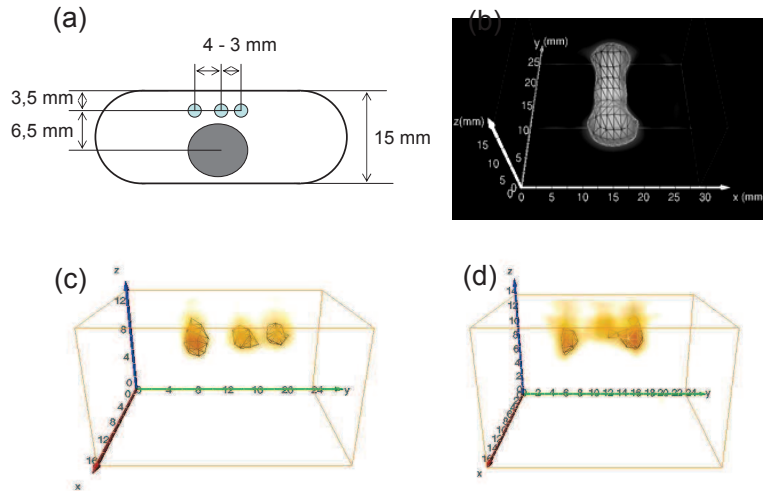


FIGURE 4.1 – (a) Schéma du fantôme utilisé pour déterminer l'influence d'une zone absorbante sur la résolution XY de 3 inclusions fluorescentes. (b) Cartographie des coefficients k^2 reconstruits par l'algorithme. (c) Reconstruction de la cartographie de fluorescence du fantôme sans absorbeur (zone absorbante remplie d'encre et d'intralipide d'absorption identique au fantôme). (d) Reconstruction de la cartographie de fluorescence obtenue en présence d'une zone 10 fois plus absorbante que le fantôme.

Nous constatons qu'en dépit d'une dégradation de 15% de la quantification du signal sur les deux inclusions distantes de 4 et 3 mm (celles de droite), on obtient une nette séparation des inclusions reconstruites. Par rapport à la situation sans absorbeur, on constate une légère fuite de la fluorescence vers le haut. On remarque également que la carte des coefficients k^2 reproduit avec une bonne localisation la zone absorbante du fantôme, même si l'on constate une forme en entonnoir au niveau des bordures du fantôme.

On en déduit que si la « résolution millimétrique » annoncée par certains est vraie

dans le cas d'un milieu homogène ou faiblement hétérogène, elle est cependant perturbée par la présence d'un organe fortement absorbant, ceci en dépit des deux contre-mesures employées (adaptation des temps d'exposition durant l'acquisition et prise en compte des hétérogénéités lors de la reconstruction). En présence d'un organe dix fois plus absorbant, il apparaît donc plus correct de dire que la résolution centre à centre dans le plan (X,Y) est approximativement de 3 mm. Mais qu'en est-il de la résolution suivant la profondeur (axe Z) ?

4.2.3 Évaluation de la résolution suivant l'axe Z

Nous introduisons dans un fantôme d'absorption et de diffusion homogènes ($\mu_a = 0,2 \text{ cm}^{-1}$ et $\mu'_s = 10 \text{ cm}^{-1}$) des inclusions fluorescentes de diamètre inférieur à 1 mm) réalisées à partir de poudre de verre coloré. Ces inclusions, séparées en Z de 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 mm, sont centrées sur l'axe du fantôme et séparées suivant X de 4,5 mm (voir figure 4.2 (a)). Après une acquisition tomographique de la totalité de la surface suivant un balayage de 23×9 points avec un pas de 2 mm, on reconstruit la carte de fluorescence, représentée sur la figure 4.2 (b).

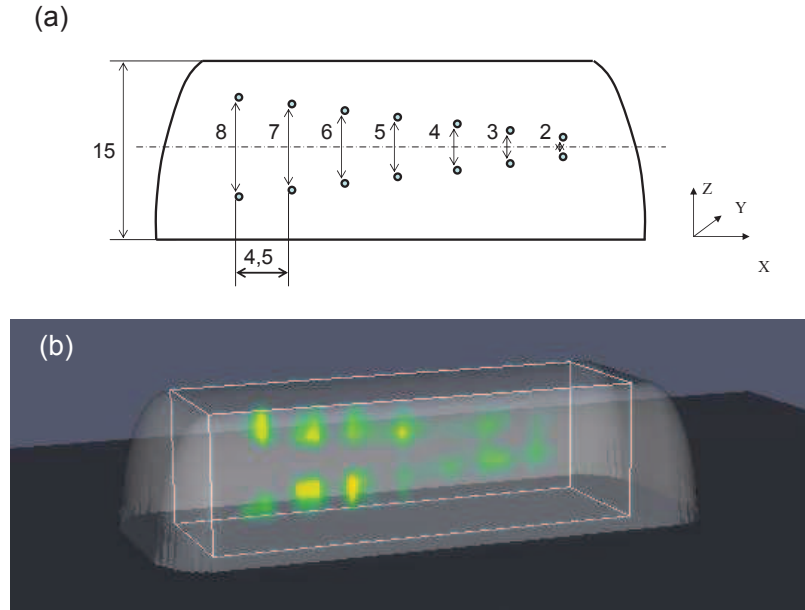


FIGURE 4.2 – (a) Schéma du fantôme utilisé pour déterminer la résolution suivant l'axe Z.

(b) Reconstruction de la cartographie de fluorescence obtenue.

On constate que l'on parvient à distinguer les inclusions séparées de 3, 4, 5, 6, 7 et 8 mm, mais pas celles dont l'espacement est de 2 mm. Nous pouvons donc en déduire que la limite de résolution suivant l'axe Z est de 3 mm pour un milieu homogène d'épaisseur 15 mm.

4.2.4 Évaluation de la capacité du système à quantifier une concentration donnée de fluorophore in-vivo (concentration détectable et linéarité)

4.2.4.1 Linéarité

Pour évaluer la capacité du système à quantifier le signal de fluorescence, nous avons implanté un capillaire contenant une quantité donnée de fluorophore dans une souris saine. Le capillaire a été placé à plusieurs profondeurs (axe Z) afin d'évaluer une éventuelle influence de la profondeur sur le signal reconstruit. Les résultats sont présentés sur la figure suivante :

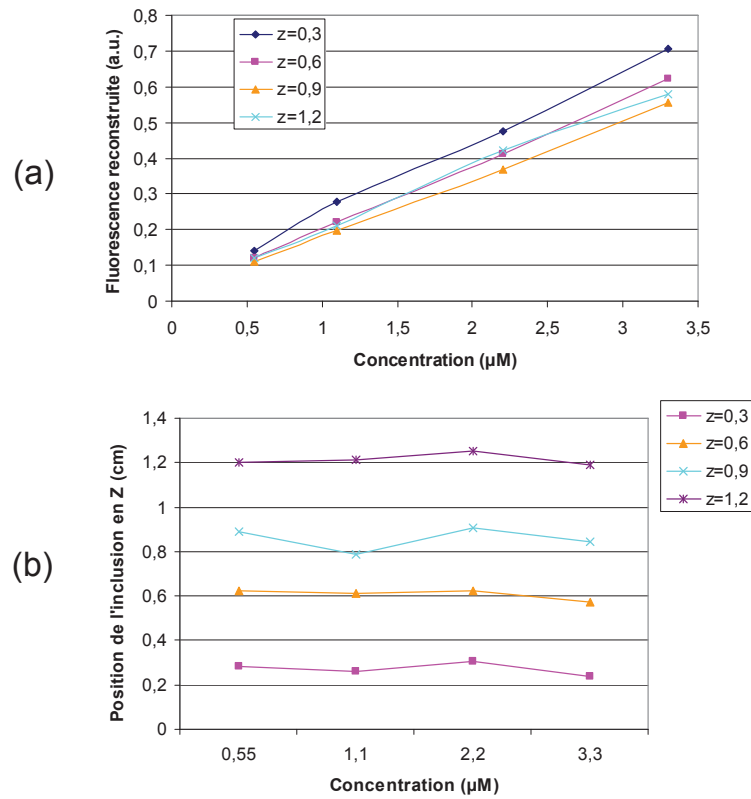


FIGURE 4.3 – Évaluation de la linéarité du tomographe (acquisition et reconstruction).
(a) Intégrale du signal reconstruit en fonction de la concentration réelle de l'inclusion fluorescente placée à plusieurs profondeurs différentes.
(b) Influence de la concentration de fluorophore sur la localisation en Z de l'inclusion.

On constate que *la fluorescence reconstruite varie linéairement avec la concentration de l'inclusion fluorescente*. La profondeur de l'inclusion a une légère influence sur la concentration reconstruite. En revanche la concentration de l'inclusion ne perturbe pas la localisation suivant l'axe Z.

4.2.4.2 Concentration minimum détectable (sensibilité)

Une étude menée en 2005 sur un système qui a depuis été commercialisé par Perkin Elmer, a établi la concentration minimum de fluorophore détectable à 250 nM [53].

Pour déterminer la sensibilité de notre tomographe, une équipe du Service Hospitalier Frédéric Joliot (A. Garofalakis *et al.*, 2010, [54]) a mené un essai comparatif de son seuil de détection avec celui d'un appareil de PET de référence. Le protocole consistait à injecter à 18 souris des doses décroissantes d'un oligonucléotide marqué à l'aide d'un fluorophore (Alexa Fluor 680, très proche de celui que nous recommandons) ou d'un marqueur PET (Fluorine-18). Cet oligonucléotide, décrit en détail dans la réf. [55], présente le double avantage de s'accumuler très rapidement dans les reins et d'être peu dégradé par l'organisme. La figure 4.4 montre la concentration de fluorophore reconstituée à l'aide de notre tomographe par rapport à celle établie par le scanner PET :

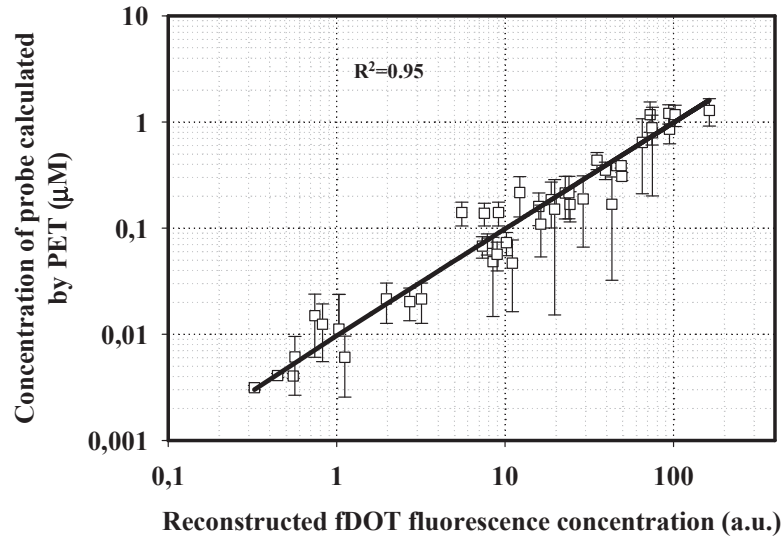


FIGURE 4.4 – Concentration de traceurs dans les reins établie par le scanner PET et corrélation avec la concentration mesurée en fluorescence par notre système (fDOT). La marge d'erreur correspond à l'incertitude due au délai entre l'injection du traceur et l'acquisition en PET et en fluorescence.

Figure tirée de A. Garofalakis *et al.* [54] avec l'autorisation de son auteur.

Cette étude a permis de montrer que notre système était capable de *détecter une concentration de fluorophore de 3 nM dans les reins*, ce qui place la sensibilité du tomographe bien en deçà de la limite précédemment établie. Les concentrations de fluorophore mesurées à l'aide du tomographe se sont également avérées en très bon accord avec celles établies par le scanner PET de référence (coefficient $R^2 = 0,95\%$).

4.3 Validation biologique de la capacité du système et de la méthode à localiser et à quantifier des tumeurs marquées dans les poumons

4.3.1 Protocole biologique

Cette étude, basée sur 7 souris immuno-déprimées, consiste à suivre l'évolution de tumeurs 10, 12 et 14 jours après injection de cellules initiatrices d'un cancer du sein, mais dont la fixation et la croissance se produisent le plus souvent dans les poumons. Ces cellules sont de type adénome TSApc (Tumor Specific Antigen).

Le protocole biologique, validé par un comité d'éthique, consiste à injecter à 7 souris 10 nanomoles de RAFT-cRGD-Alexa-700, marqueur spécifique de l'intégrine $\alpha_V\beta_3$ et décrit page 24. Trois heures après l'injection, les souris sont anesthésiées par voie gazeuse et analysées sur le tomographe. Chaque souris est placée sur un support en verre équipé de résistances chauffantes permettant de maintenir le corps de l'animal à 37°C durant l'acquisition.

Le balayage laser décrit une matrice de 11×11 positions avec un pas de 2 mm centré sur les poumons. L'acquisition des signaux de fluorescence et de diffusion dure environ 10 minutes pour chaque animal. Ces souris « malades » sont appelées M_1 à M_7 pour simplifier les notations. Trois souris saines mais également injectées, notées H_1 à H_3 servent de témoin négatif.

Lors de la reconstruction, le volume est maillé avec un pas d'échantillonnage de 2 mm dans les directions (x,y) et de 1 mm suivant l'axe z de manière à obtenir un nombre de voxels de $10 \times 10 \times 15$.

4.3.2 Résultats

La carte de fluorescence reconstruite pour la souris M_1 , 10, 12 et 14 jours après injection des tumeurs est présentée sur la figure 4.5 (a,b) :

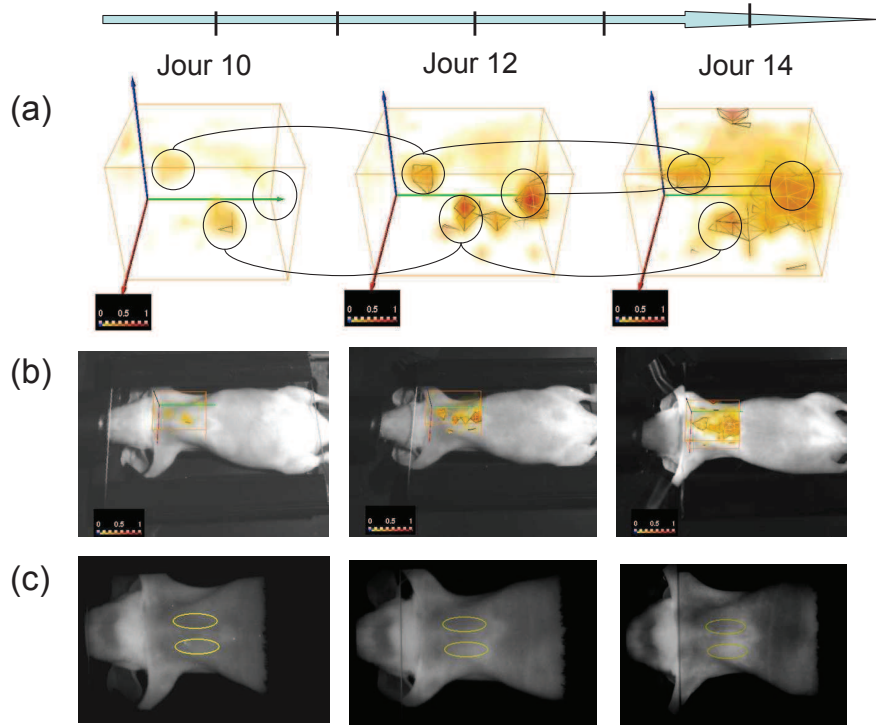


FIGURE 4.5 – (a) Reconstruction de la carte de fluorescence de la zone pulmonaire marquée à plusieurs stades de développement de la maladie, exprimés en nombre de jours après l'injection des tumeurs, sur la souris M_1 .
 (b) Superposition de la carte 3D de fluorescence reconstruite à l'image de la souris M_1 éclairée par une lumière blanche.
 (c) Image de fluorescence 2D (FRI) de la souris acquise à titre de comparaison en même temps que les images tomographiques.

On constate une *augmentation significative du niveau de fluorescence reconstruit dans les poumons entre les jours 10 et 14*. On remarque que cette augmentation n'apparaît qu'au 12ème jour, et de manière moins significative sur les images de FRI (figure 4.5 (c)), ce qui démontre l'apport de la tomographie pour quantifier le niveau de fluorescence.

L'évolution du signal de fluorescence reconstruit sur les 7 souris malades (M_1 à M_7) apparaît sur la figure suivante :

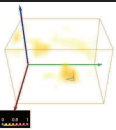
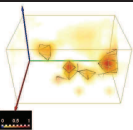
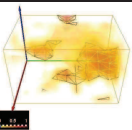
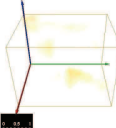
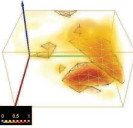
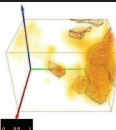
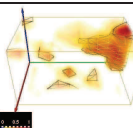
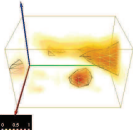
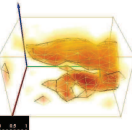
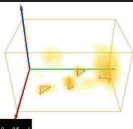
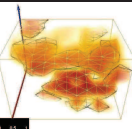
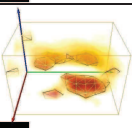
Souris	Jour 10	Jour 12	Jour 14
M_1			
M_2			Mort pendant l'acquisition
M_3		Mort pendant l'acquisition	
M_4	Pas de mesure		Mort pendant l'acquisition
M_5	Pas de mesure		
M_6	Pas de mesure		
M_7	Pas de mesure	Pas de mesure	

FIGURE 4.6 – Carte de fluorescence reconstruite dans les poumons des souris M_1 à M_7 . Les acquisitions tomographiques sont réalisées 10, 12 et 14 jours après injection des cellules tumorales. Tous les volumes sont représentés avec une échelle de couleur identique afin de permettre une comparaison quantitative.

Certaines souris n'ont pu être imagées car elles sont mortes des suites de l'anesthésie. L'augmentation du niveau de fluorescence entre les jours 10 et 14 est nettement visible pour la souris M_1 , pour laquelle nous avons les 3 acquisitions, mais aussi pour M_5 et M_6 . Au jour 14, les poumons sont envahis par les tumeurs. Les signaux observés au jour 10 pour les souris M_1 et M_2 sont très proches. Le signal de la souris M_3 est plus élevé, mais celle-ci est morte le jour suivant, ce qui est cohérent avec une évolution plus rapide de la maladie. On peut faire la même analyse pour les souris imagées au jour 12. M_2 et M_4 ont un niveau de fluorescence plus élevé et sont mortes au jour 14. Le système ne détecte pas de fluorophore dans les poumons des souris témoins (saines) H_1 à H_3 , ce qui montre que l'augmentation du signal n'est pas due aux injections successives de marqueurs mais bien à la progression du cancer.

Les résultats obtenus en tomographie 3D sont comparés à ceux obtenus en 2D. On

montre que *le 3D permet de suivre l'évolution de la maladie, alors que le 2D ne le permet pas*. Une correspondance a également été établie entre le niveau de fluorescence et le poids des tissus tumoraux [56].

4.4 Bilan des chapitres 1, 2, 3 et 4

En analysant précisément le niveau et la dynamique du signal de fluorescence d'un cas biologique réel, nous avons pu définir et mettre en place une chaîne d'acquisition tomographique optimisée pour la mesure des tissus de faible épaisseur. En définissant un ensemble laser-fluorophore-filtrage unique, nous sommes parvenus à augmenter l'intensité du signal collecté. L'analyse des sources d'incertitude de la chaîne de mesure nous a permis de définir les caractéristiques d'un détecteur adéquat et d'y associer un protocole d'acquisition permettant d'augmenter la dynamique de mesure.

Le système que nous avons mis en place et la méthode de reconstruction associée ont permis de réaliser en 2008 la première localisation de tumeurs pulmonaires chez le petit animal. Cette première démonstration de la faisabilité de la détection fluorescente dans les organes les plus absorbants rend désormais possible la localisation d'un traceur fluorescent dans tout le corps de l'animal.

Le tomographe développé dans ces travaux a été depuis lors dupliqué en cinq exemplaires qui sont actuellement utilisés dans différents laboratoires de biologie.

L'un de ces appareils a permis à une équipe du laboratoire d'Imagerie Moléculaire et Fonctionnelle (Bordeaux) de détecter des tumeurs intra-cérébrales (glioblastomes humains) implantées sur petit animal [57]. En observant ces mêmes souris dans un appareil d'IRM, cette équipe a pu montrer la bonne correspondance entre les résultats obtenus par les deux modalités d'imagerie.

Un autre système, installé à l'Institut Albert Boniot de Grenoble, est utilisé en routine pour tester de nouveaux médicaments contre le cancer [58]. Il s'agit notamment de biomolécules (DNA, siRNA, peptides, ou nanoparticules) dont la vectorisation permet de cibler spécifiquement les cellules tumorales et de déclencher l'apoptose (mort cellulaire programmée).

L'équipe du Service Hospitalier Frédéric Joliot d'Orsay a aussi montré que la sensibilité du tomographe était supérieure de deux ordres de grandeur à celle d'un autre tomographe commercialisé servant de référence [54]. Cette équipe a également montré la bonne coïncidence entre les concentrations de fluorophore mesurées par le tomographe et celles obtenues à l'aide d'un scanner PET.

Enfin pour faire face à une demande croissante, ce système est actuellement en cours de transfert industriel à une société française.

Nous pensons qu'à terme, la tomographie optique devrait permettre d'*améliorer les tests d'efficacité des nouveaux médicaments*, ainsi que de *mieux comprendre l'évolution de certaines pathologies*. Elle devrait également permettre de *limiter le recours à l'expérimentation animale*, puisque l'imagerie optique requiert pour un résultat similaire beaucoup moins d'animaux que les méthodes d'imageries basées sur des rayonnements ionisants.

Ces résultats prometteurs obtenus dans le domaine préclinique ont naturellement

conduit plusieurs équipes à tenter d'appliquer à l'homme les méthodes de tomographie de fluorescence. Dans le chapitre suivant, nous allons chercher à déterminer ce que deviennent la résolution et la sensibilité de cette technique pour des tissus d'épaisseur plus importante, représentatifs d'organes humains.

Chapitre 5

Ce tomographe continu peut-il être appliqué à l’observation de tissus plus épais ?

Le tomographe que nous venons de décrire permet donc de localiser des inclusions fluorescentes dans des tissus fortement absorbants et hétérogènes (poumons du petit animal). Le cas du petit animal correspond à une épaisseur de tissus relativement faible (1,5 cm). Il est alors tentant de se poser la question de l’application de ces techniques de tomographie continue à des tissus plus épais, comme ceux que l’on peut avoir à traiter chez l’humain.

L’objectif de ce chapitre est d’évaluer sur des tissus plus épais le tomographe que nous avons développé pour le petit animal. Nous avons choisi d’étudier le cas de la mammographie, qui correspond à des tissus compris entre 5 et 9 cm, et dont le coefficient d’absorption moyen est particulièrement favorable ($\mu_a = 0,045 \text{ cm}^{-1}$ d’après la référence [59], c’est à dire cinq fois plus faible que le coefficient d’absorption moyen du petit animal).

5.1 Systèmes ayant permis de détecter une accumulation d’ICG dans des tumeurs mammaires

Nous nous sommes intéressés en priorité aux systèmes ayant abouti à des essais cliniques. Ce critère nous paraît en effet représentatif de leur niveau de maturité. A l’heure actuelle, quatre systèmes de tomographie optique ont été utilisés pour détecter une accumulation de Vert d’Indocyanine (ICG) dans des tumeurs mammaires [60].

Le premier de ces systèmes, développé par Intes *et al.* [61], utilise 16 sources générées par une lampe et 16 détecteurs (photodiodes) répartis sur la surface du sein, en géométrie coronale. Il est schématisé sur la figure 5.1 (a) :

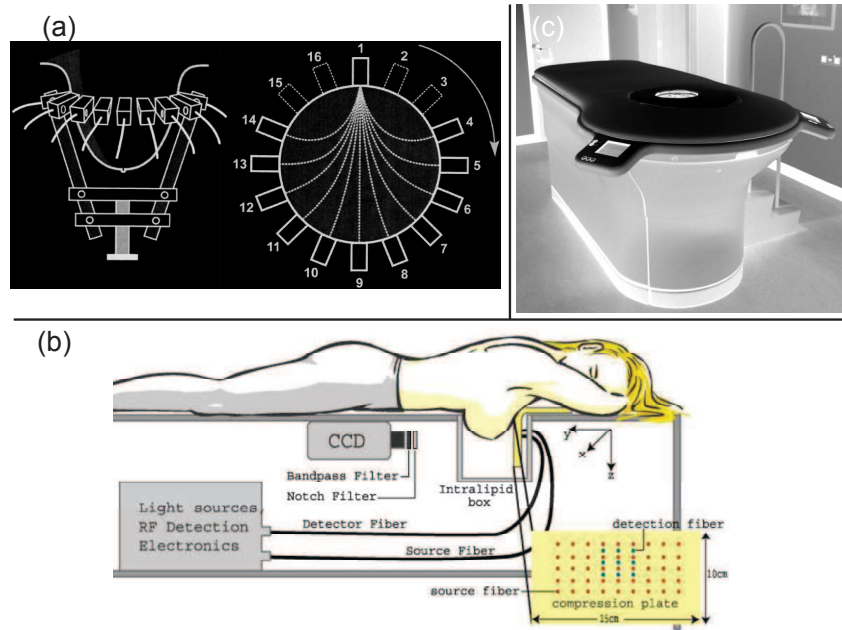


FIGURE 5.1 – Systèmes de mammographie basés sur des mesures en fluorescence et ayant permis de réaliser des études cliniques.

(a) Instrument développé par Intes *et al.* [61] basé sur une couronne de 16 sources et détecteurs.

(b) Système développé par l'Université de Pennsylvanie [32]. Ce système utilise un mode de mesure en transmission à l'aide d'une caméra et d'une source fibrée. La détection résolue en temps n'intervient que pour la détermination des coefficients d'absorption et de diffusion.

(c) Prototypé de mammographe de fluorescence développé par Philips Healthcare (photo tirée de la référence [62]).

Ce système a permis de mesurer la pharmacocinétique de l'ICG dans le sein. Les résultats obtenus ont montré en particulier que les taux de fixation et de relargage de l'ICG étaient plus lents dans les tumeurs malignes que dans les tissus sains.

Le deuxième système, développé par Ntziachristos *et al.* [23], a permis de comparer les résultats obtenus à l'aide d'un système tomographique en fluorescence (ICG également) résolu en temps, avec des mesures par IRM. Ces mesures menées sur 3 patientes, un cas de carcinome, un de fibrome, et un cas sain, ont également permis de quantifier le niveau de concentration d'ICG dans les 3 cas en mesurant la variation du coefficient d'absorption mesuré avant et après l'injection. Dans le cas d'un carcinome ductal, le niveau de concentration d'ICG estimé est de $0,1 \text{ mg.l}^{-1}$ ce qui correspond à une concentration de 120 nM . Dans un fibroadénome, il s'élève à $0,06 \text{ mg.l}^{-1}$ soit 72 nM . Ces concentrations, un peu plus faibles que celles que nous avons estimées sur le petit animal [45], peuvent s'expliquer par la moindre spécificité de l'ICG par rapport au RAFT-cRGD-Alexa-700.

Le troisième système, développé par l'équipe de Corlu *et al.* [32], a pu localiser des tumeurs mammaires sur trois patientes après une injection d'ICG (figure 5.1(b)).

L'article décrivant ces travaux ne précise pas la résolution du système mais, au vu des images obtenues après reconstruction de la carte de fluorescence, l'ordre de grandeur est centimétrique. Au cours de cette étude, les mesures tomographiques de fluorescence continue ont été comparées avec les mesures résolues en temps des propriétés endogènes des tissus. *La comparaison est en nette faveur de la fluorescence qui permet un meilleur contraste de séparation des tumeurs par rapport au tissu sain* (4 contre 1 en fluorescence et 1 contre 1,3 en endogène).

Enfin, le quatrième système, développé en 2010 par Philips Healthcare, a été utilisé dans le cadre d'un essai clinique sur 12 patientes suspectées de cancer du sein [63]. Le protocole est basé sur l'injection d'un dérivé de l'ICG développé par Bayer Schering Pharma, l'Omocyanine, marqueur qui n'est cependant pas encore commercialisé. Des doses différentes de marqueurs ont été injectées aux patientes afin de déterminer la courbe d'efficacité en fonction de la concentration. Avec une dose de concentration intermédiaire, 3 tumeurs sur 3 ont pu être détectées par le système, 8 heures après l'injection. Selon la lésion détectée, le rapport du signal reconstruit entre tissus sain et malade varie entre 1,8 et 2,8. On notera cependant que la taille conséquente des tumeurs (diamètre médian 2,9 mm) et leur faible profondeur en simplifiait la détection.

D'autres systèmes de mammographie basés sur des mesures de fluorescence présentés dans différents articles [64, 65, 66] n'ont pas encore donné lieu à des essais cliniques.

5.2 Problématique

Cette revue des études cliniques mettant en œuvre la tomographie de fluorescence a montré la capacité de cette technique à distinguer des taux de contraste entre tissus sain et tumoral compris entre 2 et 5 et du même ordre de grandeur d'une étude à l'autre.

Toutefois, la précision de localisation des inclusions fluorescentes (résolution) n'est pas explicitée. Il manque également une information sur la profondeur maximale à laquelle on peut espérer localiser une ou plusieurs inclusions fluorescentes ainsi que son influence sur la résolution des tumeurs. En effet, la profondeur maximale de détection et la résolution sont deux données importantes pour positionner la tomographie continue par rapport aux méthodes d'imagerie traditionnelles. Ces deux critères permettront également de la positionner par rapport aux méthodes résolues en temps.

L'objet de cette partie est d'évaluer la résolution maximale que l'on peut obtenir en tomographie continue sur des tissus épais et dans des conditions géométriques optimales. Les paramètres que l'on peut faire varier pour réaliser cette optimisation sont la puissance d'excitation, le bruit du détecteur, le nombre de points de balayage, et les dimensions de la zone balayée.

5.3 Adaptation de la géométrie d'acquisition aux tissus plus épais

5.3.1 Résolution obtenue sans optimisation de la géométrie d'acquisition

Le premier objectif consiste à évaluer la capacité du tomographe à détecter une inclusion fluorescente plongée dans 6 cm de solution diffusante aux propriétés optiques similaires à celles du sein.

Les premières acquisitions sont menées avec les réglages par défaut du tomographe : un balayage du laser de 7 x 9 positions avec un pas de 2 mm. La zone reconstruite correspond donc à un parallélépipède de 12x16x60 mm. L'inclusion fluorescente simulant la tumeur est un cylindre de plexiglas de 8 mm de longueur et de 3 mm de diamètre placé au centre d'une cuve contenant un mélange d'intralipide et d'encre simulant le sein ($\mu_a = 0,045 \text{ cm}^{-1}$ et $\mu'_s = 7,7 \text{ cm}^{-1}$, selon la référence [59])

Les cartes de fluorescence obtenues après reconstruction sont présentées sur la figure 5.2 sous forme de coupes suivant le plan (X,Y), espacées tous les 2 mm selon l'axe Z.

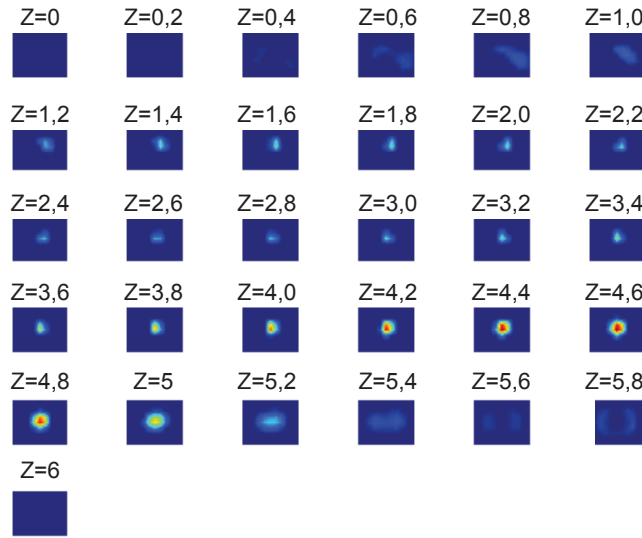


FIGURE 5.2 – Reconstruction de la cartographie de fluorescence d'un milieu diffusant de 6 cm d'épaisseur au centre duquel se trouve une inclusion. Chaque vignette correspond à une coupe du milieu suivant le plan (X,Y).

Nous constatons que l'inclusion reconstruite n'est pas localisée correctement (sa position réelle était en $z=3$ cm) et apparaît avec une résolution de 4 cm suivant l'axe Z.

Nous allons montrer qu'il est possible d'améliorer la résolution en optimisant les paramètres géométriques d'acquisition. En augmentant la surface balayée par le laser

(ou la zone de détection), il doit être possible d'augmenter l'écart de signal mesuré par des inclusions situées à des profondeurs différentes.

5.3.2 Disque d'excitation et de détection optimaux

5.3.2.1 Définitions

Nous définissons le *disque d'excitation optimal* comme la zone devant être balayée par le laser pour assurer une localisation la plus précise possible de l'inclusion (voir figure 5.3).

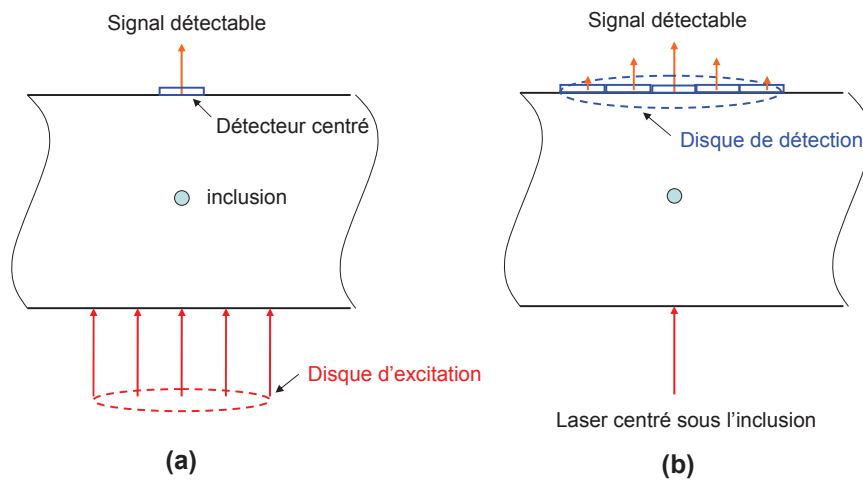


FIGURE 5.3 – (a) Le disque d'excitation optimal correspond à la zone balayée pour laquelle la résolution obtenue après reconstruction est optimale. La première étape consiste à déterminer le rayon maximal pour lequel le signal est supérieur à $3\sigma_{\text{bruit}}$. (b) Le disque de détection optimal correspond à la zone que l'on doit imager pour parvenir à la meilleure résolution possible.

Il s'agit de réaliser un compromis : si le disque dépasse une certaine dimension, l'épaisseur de tissu traversée par la lumière devient trop importante pour que la lumière de fluorescence soit détectable. Si le disque est trop petit, la résolution sera dégradée.

Par analogie, nous définissons le *disque de détection optimal* comme la zone sur laquelle on doit réaliser la détection pour obtenir la meilleure résolution spatiale de l'inclusion.

5.3.2.2 Disque d'excitation optimal

Pour déterminer expérimentalement le diamètre du disque d'excitation optimal, nous plaçons une inclusion fluorescente de concentration $10\mu M$ au centre d'une solution diffusante et absorbante représentative des propriétés optiques du sein. On s'intéresse au signal provenant du détecteur situé à la verticale de l'inclusion. Le système est identique à celui décrit page 49.

Le laser étant initialement situé sous l'inclusion, on déplace celui-ci de part et d'autre suivant un axe, et on acquiert une image avec un temps d'intégration de 30 s à chaque position. Puis, on extrait sur ces images le niveau de gris moyen sur un groupe de 4 pixels, correspondant à un « détecteur élémentaire » du point de vue de la reconstruction. Ce temps d'exposition correspond à ce qu'on estime être le maximum raisonnable dans le cadre d'une application clinique (étant donné que le nombre de points de mesure peut être élevé et que la patiente n'est pas endormie). La courbe montrant la valeur moyenne du signal mesuré en fonction de la position de la source par rapport à la verticale de l'inclusion apparaît sur la figure suivante :

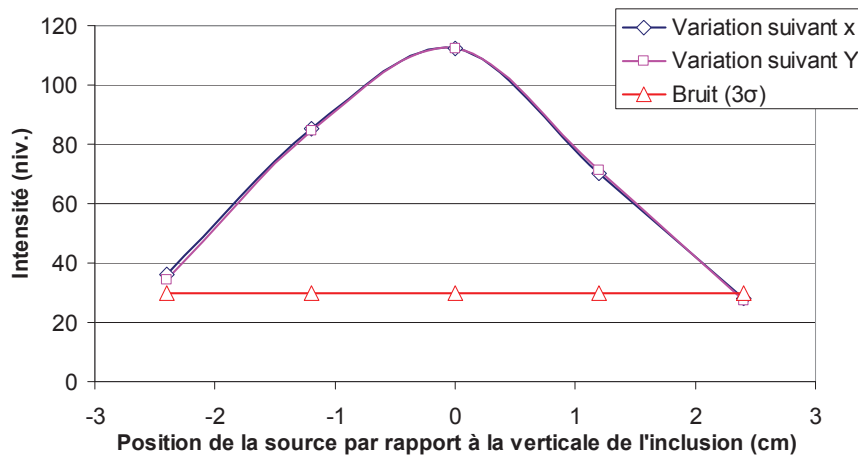


FIGURE 5.4 – Signal de fluorescence moyen mesuré sur un groupe de 4 pixels lors d'un balayage de la source laser sous l'inclusion suivant l'axe X puis, suivant l'axe Y.

Nous constatons que le rayon du disque d'excitation optimal vaut 2,5 cm pour un signal supérieur à $3\sigma_{\text{bruit}}$. Dans le cas d'un détecteur parfait, le rayon du disque d'excitation optimal serait de 3 cm, ce qui correspond à l'épaisseur du milieu diffusant traversée.

5.3.2.3 Disque de détection optimal

Pour déterminer le disque de détection optimal, nous plaçons la source de lumière à la verticale de l'inclusion et réalisons une acquisition unique. Le profil horizontal du signal de fluorescence apparaît sur la figure 5.5.

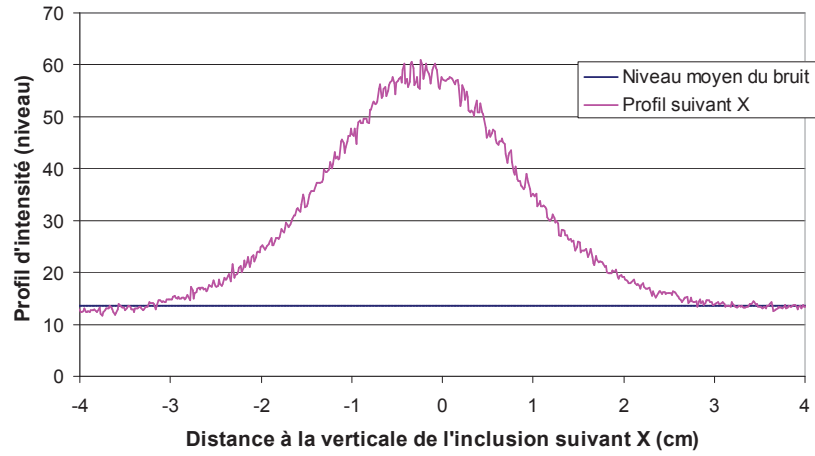


FIGURE 5.5 – Signal de fluorescence moyen mesuré sur un groupe de 4 pixels lors d’un balayage de la source laser sous l’inclusion suivant l’axe X.

L’intersection entre le profil d’intensité et le niveau de bruit correspond à un écart à la verticale de l’inclusion de 3 cm. Dans ces conditions expérimentales, le rayon du disque de détection optimal vaut donc 3 cm.

Cette similitude entre les disques d’excitation et de détection s’explique par la symétrie de la géométrie d’excitation et de détection.

5.3.3 Influence de la concentration du fluorophore sur les paramètres géométriques optimaux

Les diamètres optimaux que nous avons déterminés l’ont été pour une concentration et un nombre de moles élevés de fluorophore. Nous allons chercher à déterminer ce qu’ils deviennent pour des concentrations « réalistes », c’est à dire plus faibles.

Nous nous plaçons dans le cadre du modèle de la diffusion dans un milieu infini. Dans ce cadre, si les propriétés optiques sont homogènes, on peut utiliser les fonctions de Green, formules analytiques permettant de calculer le flux d’énergie diffus en chacun des points du milieu (voir page 17).

En calibrant le modèle sur une mesure expérimentale pour une valeur de concentration de fluorophore donnée, nous extrapolons le signal que l’on obtiendrait pour d’autres valeurs de la concentration. Nous faisons donc implicitement l’hypothèse que le signal de fluorescence est proportionnel à la concentration en fluorophore. Par expérience, cette hypothèse reste valable pour des concentrations inférieures ou égales à $10\mu M$, limite au-delà de laquelle des phénomènes non linéaires apparaissent (effet d’écran et d’agrégation des fluorophores).

La figure 5.6 montre le rayon du disque d’excitation pour que le signal parvenant au détecteur soit mesurable :

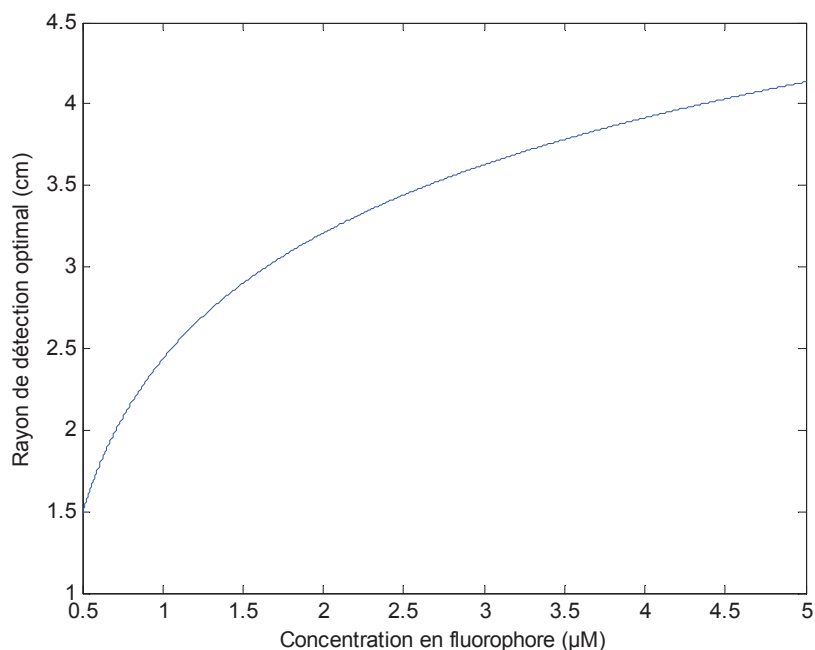


FIGURE 5.6 – Courbe montrant l'évolution du disque de détection optimal en fonction de la concentration en fluorophore. L'allure de la courbe donnant le disque d'excitation optimal en fonction de la longueur d'onde est similaire.

D'après ce graphique, il est possible de détecter jusqu'à une valeur minimale de concentration de fluorophore de 200 nM . C'est un résultat important car on sait désormais qu'au-dessous de cette valeur, le disque de détection tend très rapidement vers zéro, ce qui signifie que l'on ne détecte plus de fluorescence.

Un autre résultat important concerne les valeurs de concentrations faibles, mais détectables (entre 200 nM et 500 nM). Pour ces valeurs, le disque d'excitation fournissant un signal supérieur au bruit du détecteur devient petit, par exemple, $1,5\text{ cm}$ pour une concentration de 500 nM . L'angle de vue du système sur l'inclusion est donc réduit, ce qui entraîne une dégradation de la résolution comme nous allons le montrer.

5.4 Résolution obtenue sur des tissus épais à l'aide d'une méthode de reconstruction en continu

Pour évaluer cette influence, nous simulons la carte de fluorescence reconstruite pour différents rayons des disques d'excitation et de détection. L'algorithme est identique à celui que nous avons utilisé pour le petit animal (voir page 60) mais les paramètres géométriques sont adaptés à l'épaisseur plus grande des tissus. Le volume considéré, de dimensions $12 \times 12 \times 6\text{ cm}$ est échantillonné à l'aide d'un maillage régulier avec un pas de 1 mm .

Dans un premier temps, nous cherchons à déterminer la résolution maximale possible, c'est-à-dire celle que l'on pouvait obtenir par un disque d'excitation de diamètre

infini. Pour cela, nous paramétrons la simulation pour des sources et des détecteurs couvrant toute la surface du volume considéré (les sources se déplacent de ± 6 cm et les détecteurs couvrent toute la surface). Le résultat apparaît identique à celui obtenu pour le disque d'excitation optimal, pour lequel les sources se déplacent de ± 3 cm, ce qui est en accord avec nos observations expérimentales (page 75).

Pour déterminer l'impact sur la résolution d'une réduction du disque d'excitation et de détection, nous faisons successivement prendre à $R_{excitation}$ et $R_{détection}$ les valeurs : 6, 4, 2 et 1 cm. Les résultats obtenus apparaissent sur la figure suivante :

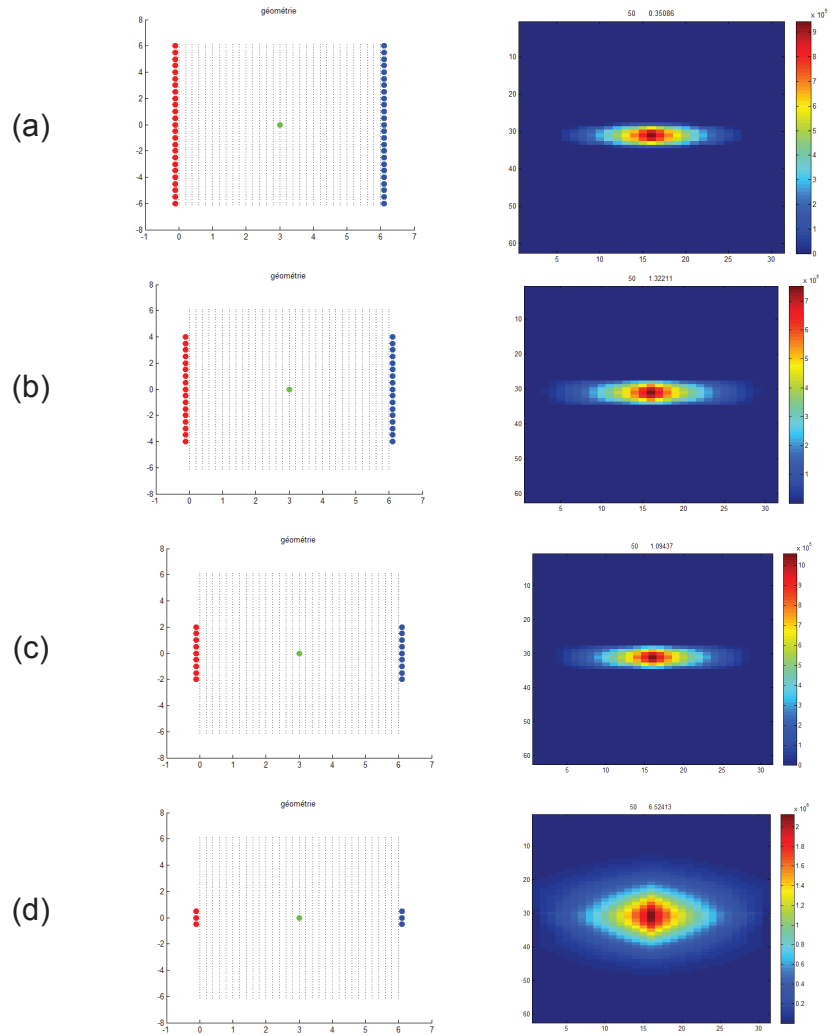


FIGURE 5.7 – Influence du disque d’excitation et de détection sur la résolution de l’inclusion.

A gauche : position relative des sources, des détecteurs et de l’inclusion.

A droite : coupe suivant le plan (X,Z) de la carte de fluorescence reconstruite.

Les distances sont exprimées en nombre de mailles. Les valeurs de fluorescence sont en unités arbitraires.

Nous constatons que la résolution diminue lorsque le rayon du disque d’excitation devient inférieur ou égal à 2 cm.

On pourrait penser que cette perte de résolution n’est pas due à la taille du disque mais à la diminution du nombre de sources et de détecteurs. Pour lever cette ambiguïté, nous maintenons le rayon du disque d’excitation à 1 cm tout en augmentant le pas des sources. La résolution de l’inclusion ne s’en trouvant pas améliorée, nous pouvons en conclure que c’est bien la diminution de la surface balayée qui est à l’origine de la perte

de résolution et non la diminution du nombre de sources ou détecteurs.

Dans les deux cas, nous constatons que la résolution de l'inclusion est meilleure suivant X que suivant Z, comme dans le cas des tissus de faible épaisseur (voir page 63).

Dans des conditions géométriques optimales, la largeur à mi-hauteur de la tâche reconstruite est estimée à 8 mm suivant l'axe X, et à 28 mm suivant Z. On peut donc en conclure que sur un tissu de 6 cm d'épaisseur, la résolution suivant Z ne pourra être meilleure que 28 mm.

5.5 Bilan de la deuxième partie

Dans cette partie, nous avons analysé et évalué les performances de la tomographie continue appliquée à différents types de tissus.

Nous avons vu que cette technique était très appropriée pour l'observation de tissus de faible épaisseur. En effet, elle est capable de détecter et de quantifier des inclusions fluorescentes avec une excellente sensibilité, identique à celle du PET (voir page 65), tout en étant beaucoup moins lourde à mettre en oeuvre. La résolution obtenue, millimétrique suivant le plan de balayage laser et proche de 3 mm suivant la profondeur, convient à la plupart des applications. De plus il est possible, comme l'ont montré d'autres travaux du LISA, d'obtenir une résolution millimétrique selon les trois axes en passant à une géométrie d'acquisition cylindrique [67].

L'originalité de notre approche consiste à proposer un ensemble d'éléments optimaux de la chaîne d'acquisition tomographique permettant de maximiser le signal de fluorescence détecté, condition indispensable à l'observation des organes fortement absorbants. Combiné à une méthode de reconstruction originale, le système a permis de réaliser le premier suivi longitudinal d'évolution de tumeur pulmonaire en préclinique.

Dans le cadre d'un projet ANR, plusieurs prototypes identiques à ce système ont été installés dans différents laboratoires de biologie. Les nombreuses études menées ont permis de mieux positionner la tomographie de fluorescence par rapport à d'autres modalités d'imagerie précliniques telles que le PET [54]. et l'IRM [57]. D'autres études ont permis de tester sur le petit animal la biodistribution de marqueurs ou de médicaments [58, 68].

En revanche, nous avons montré que la tomographie continue ne peut être transposée directement à l'étude des tissus plus épais, même dans une géométrie favorable (en transmission). L'origine de la difficulté n'est pas un manque de sensibilité : celle-ci demeure suffisante pour des tissus faiblement absorbants (sein). Elle se situe au niveau de la résolution en profondeur, qui dépasse un centimètre pour des tissus d'une épaisseur supérieure à 5 cm.

Afin d'évaluer l'applicabilité de cette technique au diagnostic médical, nous avons testé la capacité du système à localiser des inclusions dans des tissus plus épais. Dans un milieu de 6 cm d'épaisseur simulant les propriétés optiques du sein, nous avons pu localiser une inclusion fluorescente représentative d'une tumeur réelle, avec une précision de 8 mm suivant le plan (X,Y) et de 28 mm suivant Z.

Pour améliorer la résolution, les paramètres géométriques (disque d'excitation et de détection, espacement entre les sources) ont été optimisés pour la mesure sur des tissus

épais. Nous avons notamment montré qu'il n'est pas nécessaire de balayer les zones les plus éloignées de l'inclusion, même si celles-ci sont génératrices de signal de fluo. En revanche lorsque la zone balayée devient plus étroite, la résolution de l'inclusion est dégradée, même en diminuant le pas entre les positions du laser.

Même dans les conditions les plus favorables (paramètres géométriques optimisés, et absence de bruit), il est difficile d'obtenir une résolution plus fine que 1 cm, ce qui paraît insuffisant pour la plupart des applications médicales.

Pour repousser cette limite de résolution dans les tissus plus épais, nous avons décidé de faire évoluer le système vers une instrumentation résolue en temps, ce qui fait l'objet de la troisième partie.

Troisième partie

Optimisation d'un tomographe de fluorescence résolu en temps pour l'observation des tissus épais

Introduction (guide de lecture de la partie)

Dans la deuxième partie, nous avons montré que les systèmes et méthodes de tomographie continue permettent de localiser efficacement des inclusions dans des tissus de faible épaisseur, tels que ceux des petits animaux. En revanche, pour les épaisseurs plus importantes (organes humains), la résolution en profondeur, centimétrique, apparaît insuffisante au regard des applications visées et des méthodes d'imagerie de référence telles que l'IRM ou le PET.

Plusieurs équipes ont montré que le passage à des systèmes optiques et à des méthodes résolues en temps permettait d'améliorer la résolution.

Toutefois, les systèmes expérimentaux mis en œuvre sont très différents d'une équipe à l'autre. Certains utilisent plusieurs chaînes de comptage résolues en temps, et d'autres font le choix d'une caméra rapide intensifiée pour des applications identiques. Parmi les différentes stratégies expérimentales permettant d'effectuer ce type de mesure, il ne semble pas émerger de technique privilégiée.

Pour résoudre ce problème, il est nécessaire de comprendre parfaitement l'impact de l'instrument sur la précision de mesure du temps de vol moyen. En connaissant cet impact, il devient alors possible de déterminer l'instrument le plus approprié et de le paramétrer au mieux pour réaliser une mesure de l'intensité et du temps de vol moyen la plus précise possible.

Dans le chapitre 1, page 86, nous rappellerons le principe d'une mesure résolue en temps et montrerons comment la mesure combinée de l'intensité et du temps de vol moyen peut améliorer la résolution d'une inclusion fluorescente. Nous établirons également un état de l'art des systèmes de mesure de fluorescence résolus en temps et mettrons en évidence les deux grandes familles de systèmes employés pour réaliser ce type de mesure : celle qui utilise une caméra rapide intensifiée ou HRI (pour « High Rate Imager »), et celle qui repose sur des chaînes de comptage résolues en temps ou TCSPC (pour « Time Correlated Single Photon Counting System »).

Le problème traité dans le chapitre 2 page 98, consistera à déterminer, de ces deux systèmes de détection, celui qui offre la meilleure sensibilité. Celle-ci, en effet, est importante à deux titres : d'une part elle détermine directement la précision de mesure de l'intensité, et d'autre part, elle contribue à la précision de mesure du temps de vol moyen par un effet statistique. Pour comparer la sensibilité d'un HRI et d'une chaîne TCSPC, nous nous appuierons sur des mesures réalisées sur deux bancs expérimentaux et sur des simulations. Nous proposerons également une modélisation mathématique originale de certains paramètres expérimentaux, comme par exemple, la part de photons comptabilisée par un système de fenêtrage temporel.

Dans le chapitre 3 page 108, nous comparerons les performances respectives des deux chaînes pour la mesure du temps de vol moyen et déterminerons quel est, du HRI ou du TCSPC, le système le plus adapté en fonction des caractéristiques du milieu et de la profondeur des inclusions fluorescentes que l'on souhaite localiser.

A l'aide des modèles développés, nous proposerons dans le chapitre 4 page 127, une méthodologie permettant d'optimiser les paramètres expérimentaux des deux chaînes de mesure pour obtenir une mesure des temps de vol aussi précise que possible.

Enfin, dans le chapitre 5 page 136, nous montrerons comment ces résultats peuvent

être mis en pratique pour réaliser un détecteur optimal répondant à une problématique clinique concrète : l'amélioration du diagnostic du cancer de la prostate par tomographie de fluorescence résolue en temps.

Chapitre 1

Apport de la mesure résolue en temps pour la localisation d'une inclusion fluorescente

La démonstration de l'apport des méthodes résolues en temps pour la localisation d'une inclusion fluorescente a été initiée au LISA au cours des thèses d'Aurélie Laidevant [69] et de Nicolas Ducros [70]. Ce dernier a notamment montré que l'information temporelle permettait d'améliorer la localisation d'une inclusion dans le cas d'une géométrie de mesure en transmission.

Depuis, Lionel Hervé a développé une méthode basée sur l'hypothèse d'une inclusion fluorescente unique ou double. Cette méthode requiert de mesurer *l'intensité* et le *temps de vol moyen* des photons.

Dans ce premier chapitre, nous présenterons brièvement cette méthode de localisation, et illustrerons son apport dans le cas particulier d'une géométrie de réflexion. Puis, nous ferons une revue comparative des systèmes existants capables de réaliser ce type de mesure avec une précision suffisante.

1.1 Principe de la mesure par temps de vol moyen

La mesure du temps de vol moyen de fluorescence consiste à envoyer une brève impulsion lumineuse (typiquement 0,1 à 50 ps) en un point de la surface du tissu, puis à mesurer le temps de parcours de cette impulsion laser jusqu'au détecteur :

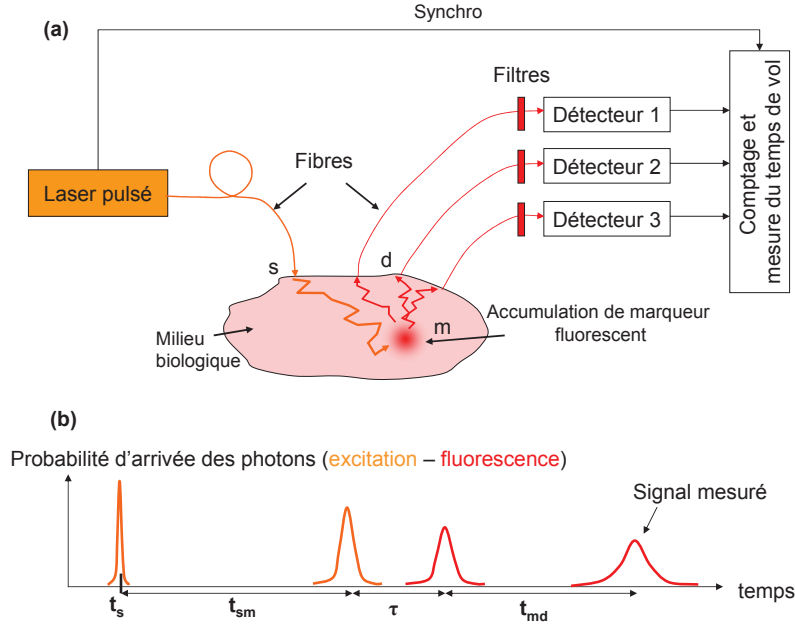


FIGURE 1.1 – (a) Schéma d'un dispositif expérimental typique basé sur un seul point source et trois points de détection.

(b) Chronogramme montrant les différentes contributions au temps de vol moyen : parcours de la lumière d'excitation de la source vers l'inclusion, déclin de fluorescence, parcours de la fluorescence jusqu'au détecteur. Le temps de vol mesuré correspond à la somme de ces délais.

Ce temps de parcours est appelé *temps de vol moyen*. Il correspond à la somme des temps moyens suivants :

- $\langle t_{sm} \rangle$ le temps moyen de parcours de la lumière de la source jusqu'à l'inclusion fluorescente
- τ le déclin de fluorescence
- $\langle t_{md} \rangle$ le temps moyen de parcours de l'inclusion fluorescente jusqu'au détecteur.

D'un point de vue formel, on définit le temps de vol moyen $\langle t \rangle$ d'une distribution temporelle $f(t)$ mesurée par un détecteur par la formule :

$$\langle t \rangle = \frac{f^{(1)}}{f^{(0)}} \quad (1.1)$$

avec $f^{(0)}$ et $f^{(1)}$ désignant respectivement les moments d'ordre 0 et 1 de la distribution $f(t)$ tels que :

$$f^{(0)} = \int_{-\infty}^{+\infty} f(t) dt \quad (1.2)$$

$$f^{(1)} = \int_{-\infty}^{+\infty} t \times f(t) dt \quad (1.3)$$

Ces notions vont nous permettre d'établir le lien entre les temps de vol mesurés et la distance parcourue par la lumière.

1.2 Relation entre les temps de vol et la distance parcourue dans le milieu

1.2.1 Moments d'ordre 0 et 1 du flux d'énergie diffus

On cherche à établir la relation théorique qui existe entre les temps de vol moyen des photons et la distance moyenne parcourue par la lumière entre une source et un détecteur. La propagation de la lumière dans un milieu diffusant suit l'équation de diffusion, introduite page 15, et rappelée ci-dessous :

$$\frac{n}{c} \frac{\partial G_s(\vec{r}, t)}{\partial t} + D(\vec{r}) \Delta G_s(\vec{r}, t) + \mu_a \phi(\vec{r}, t) = \delta(\vec{r}, t) \quad (1.4)$$

avec $G_s(\vec{r}, t)$ désignant le flux d'énergie diffus résultant d'une source correspondant à un Dirac $\delta(\vec{r}, t)$.

Une résolution directe nécessiterait de résoudre autant de fois l'équation de la diffusion en continu en chaque point du vecteur temps, ce qui serait très coûteux en espace mémoire et en temps de calcul.

Pour simplifier la résolution, on s'intéresse aux deux premiers moments de G_s . Pour les faire apparaître, on multiplie les termes de l'équation 1.4 par t et en intégrant suivant t , on obtient les équations de propagation pour $G^{(0)}$ et $G^{(1)}$:

$$-\Delta G_s^{(0)}(\vec{r}) + k G_s^{(0)}(\vec{r}) = \delta(\vec{r} - \vec{r}_s) \quad (1.5)$$

$$-\Delta G_s^{(1)}(\vec{r}) + k G_s^{(1)}(\vec{r}) = \frac{n G^{(0)}(\vec{r})}{c D} \quad (1.6)$$

Or, dans le cas d'un milieu homogène et infini, des solutions analytiques existent et sont données par :

$$G_s^{(0)}(\vec{r}) = \frac{\exp(-k|\vec{r} - \vec{r}_s|)}{4\pi D|\vec{r} - \vec{r}_s|} \quad (1.7)$$

$$G_s^{(1)}(\vec{r}) = \frac{\exp(-k|\vec{r} - \vec{r}_s|)}{4\pi D\nu} \quad (1.8)$$

avec le terme ν donné par l'expression [70] :

$$\nu = 2 \frac{c}{n} \sqrt{\frac{\mu_a}{3(\mu_a + \mu'_s)}} \quad (1.9)$$

1.2.2 Équation temps de vol - distance

En divisant les termes de l'équation 1.8 par ceux de 1.7, on obtient [70] :

$$\langle t \rangle = \frac{G_s^{(1)}(\vec{r})}{G_s^{(0)}(\vec{r})} = \frac{|\vec{r} - \vec{r}_s|}{\nu} \quad (1.10)$$

Cette équation établit une relation entre le temps de vol moyen des photons t et la distance $|\vec{r} - \vec{r}_s|$ parcourue par la lumière pendant cette durée. On peut ainsi considérer que ν représente la vitesse moyenne des photons dans le milieu en tenant compte des diffusions et des absorptions.

L'expression de la vitesse donnée par l'équation 1.9 montre que celle-ci augmente avec le coefficient d'absorption μ_a . En effet, dans des milieux fortement absorbants, seuls les photons subissant peu de déviations ont une chance de parvenir à destination. Dans les milieux faiblement absorbants, au contraire, les trajets des photons peuvent comprendre un plus grand nombre de déviations, ce qui entraîne une vitesse de propagation globalement plus lente. On constate également que la vitesse moyenne de propagation ν augmente lorsque le coefficient de diffusion réduit μ'_s diminue. À titre d'exemple, la vitesse moyenne de la lumière dans les seins vaut $1,64 \text{ cm.ns}^{-1}$, alors qu'elle vaut $5,10 \text{ cm.ns}^{-1}$ dans un organe fortement absorbant comme la prostate.

Mesurer les moments d'ordre 0 et 1 du flux d'énergie diffus $G(\vec{r}, t)$ nous permet donc de remonter à la distance entre le détecteur et la source de lumière. Nous allons plus précisément voir comment dans la prochaine section.

1.3 Méthode de localisation par mesure de l'intensité et du temps de vol moyen

Cette méthode, développée par Lionel Hervé, a été décrite en détail dans un article récent [71].

Elle est basée sur l'hypothèse de l'existence d'une inclusion unique de position \vec{r} inconnue.

Soient $U_{sd}^m(\vec{r}, t)$ le signal d'émission de fluorescence généré par la source s et mesuré par le détecteur d et U_{sd}^x le signal d'excitation diffusé pour ce même couple source-détecteur. En faisant l'hypothèse que la réponse impulsionnelle du système est identique pour la longueur d'onde d'excitation et d'émission, on peut écrire $U_{sd}^m(\vec{r}, t)$ et U_{sd}^x comme les produits de convolution suivants (cf. page 161) :

$$U_{sd}^m(\vec{r}, t) = (G_s(\vec{r}) \star F(\vec{r}) \star G_d(\vec{r}) \star IRF_{sd})(t) \quad (1.11)$$

$$U_{sd}^x(\vec{r}, t) = (G_{sd} \star IRF_{sd})(t) \quad (1.12)$$

avec G_s , G_d et G_{sd} les fonctions de Green associées respectivement aux distances source-inclusion, inclusion-détecteur et source-détecteur. $F(t)$ désigne le déclin de fluorescence, $IRF_{sd}(t) = (S_s \star D_d)(t)$ la réponse impulsionnelle de l'instrument à un Dirac

temporel (« Impulse Response Function ») pour le couple sd , et G_{sd} la fonction de Green correspondant au parcours de la lumière entre la source et le détecteur.

Soient $I(U_{sd})$ et $t(U_{sd})$ l'intensité et le temps de vol moyen correspondant à ces signaux. A l'aide du théorème de Fubini, on peut montrer que le moment d'ordre 0 d'un produit de convolution est le produit des moments d'ordre 0 des fonctions et que le moment d'ordre 1 de ce même produit est la somme des moments d'ordre 1 de ses fonctions. Ce qui conduit à :

$$\frac{I(U_{sd}^m)}{I(U_{sd}^x)} = \frac{G_s^{(0)} \times F^{(0)} \times G_d^{(0)}}{G_{sd}^{(0)}} \quad (1.13)$$

$$t(U_{sd}^m) - t(U_{sd}^x) = \frac{G_s^{(1)}}{G_s^{(0)}} + \tau + \frac{G_d^{(1)}}{G_d^{(0)}} - \frac{G_{sd}^{(1)}}{G_{sd}^{(0)}} \quad (1.14)$$

On constate que les ratios 1.13 et 1.14 ne dépendent plus de l'IRF de l'instrument ! Ces grandeurs, que nous noterons $I_{sd\text{théorique}} = \frac{I(U_{sd}^m)}{I(U_{sd}^x)}$ et $t_{sd\text{modèle}} = t(U_{sd}^m) - t(U_{sd}^x)$, ne sont donc plus affectées par les différences de gain, ou de distance entre les différents couples source/détecteur.

La localisation de l'inclusion est obtenue en quatre étapes :

1ère étape. Modèle direct : pour chaque position possible \vec{r}_m de l'inclusion et chaque couple source-détecteur sd , nous calculons les deux premiers moments des fonctions de Green $G_s^{(0)}$, $G_d^{(0)}$, $G_s^{(1)}$ et $G_d^{(1)}$.

2ème étape. Détermination de la concentration en fluorophore : pour chaque voxel m , nous estimons le coefficient $F^{(0)}(\vec{r}_m)$ minimisant l'écart entre les intensités théoriques (fournies par le modèle des fonctions de Green) et les intensités expérimentales (méthode des moindres carrés pondérés) :

$$F_m^{(0)} = \arg(\min(\chi_{1m}^2)) \quad (1.15)$$

$$\chi_{1m}^2 = \sum_{s,d} \frac{(I_{sd\text{modèle}} - I_{sd\text{mesuré}})^2}{\text{var}(I_{sd\text{modèle}})} \quad (1.16)$$

où $I_{sd\text{mesuré}}$ désigne le rapport entre l'intensité du signal de fluorescence et celle du signal de diffusion. L'opérateur $\text{var}(I_{sd\text{modèle}})$ représente une modélisation de la variance de l'intensité obtenue à partir du bruit photonique et des fluctuations du laser.

3ème étape. Détermination de la position de l'inclusion : pour chaque voxel m , nous calculons la somme des carrés des résidus correspondant à l'écart entre les intensités et les temps de vols théoriques et expérimentaux.

$$\chi_{2m}^2 = \frac{1}{2} \sum_{s,d} \frac{(I_{sd\text{modèle}} - I_{sd\text{mesuré}})^2}{\text{var}(I_{sd\text{modèle}})} + \frac{1}{2} \sum_{s,d} \frac{(t_{sd\text{modèle}} - t_{sd\text{mesuré}})^2}{\text{var}(t_{sd\text{modèle}})} \quad (1.17)$$

avec $t_{sd\text{mesuré}}$ correspondant à la différence entre le temps de vol moyen du signal de fluorescence et celui de diffusion.

4ème étape. On applique un seuillage bas sur χ_{2m}^2 pour faire apparaître la localisation la plus probable de l'inclusion.

1.4 Exemple d'amélioration de la résolution temporelle par les temps de vol en géométrie de réflexion

La figure 1.2 montre la comparaison entre une reconstruction réalisée à l'aide des seules mesures d'intensité et des mesures de temps de vol moyen. Le système mis en place pour réaliser ces mesures sera décrit page 100. L'inclusion fluorescente se situe à une profondeur de 2,5 cm d'un milieu absorbant et diffusant de 5 cm d'épaisseur et simulant les propriétés optiques de la prostate humaine ($\mu_a = 0,4 \text{ cm}^{-1}$, $\mu'_s = 7 \text{ cm}^{-1}$).

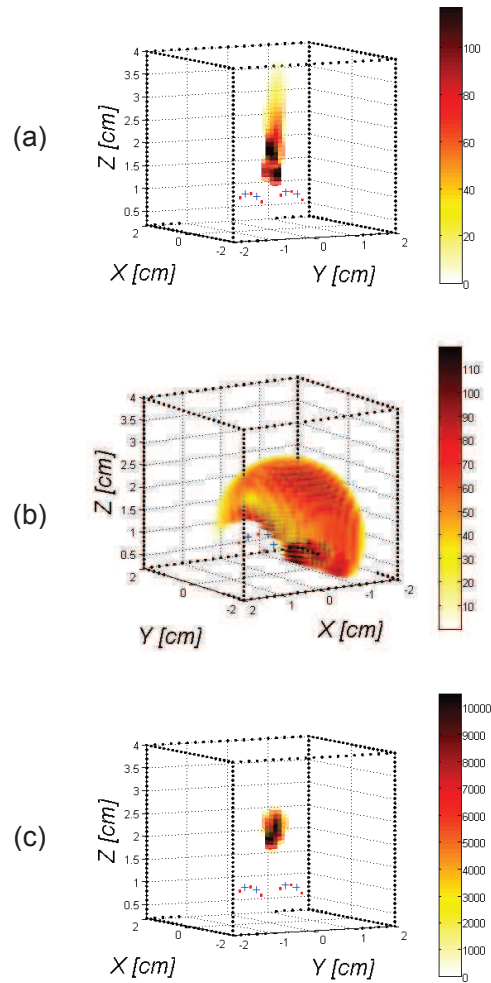


FIGURE 1.2 – Comparaison de la localisation d'une inclusion fluorescente réalisée à l'aide des seules mesures d'intensité et des mesures de temps de vol, en géométrie de réflexion. Les points bleus correspondent à la position des détecteurs, les points rouges à ceux des sources. L'échelle de fluorescence reconstruite est en unité arbitraire.

- (a) localisation de l'inclusion en utilisant uniquement les mesures d'intensité
- (b) localisation de l'inclusion en utilisant uniquement les temps de vol moyens
- (c) utilisation combinée des intensités et des temps de vols.

Nous constatons que la mesure d'intensité permet une bonne résolution suivant le plan (X,Y), et que le temps de vol moyen donne une localisation précise suivant l'axe Z. La combinaison de ces deux informations est donc essentielle pour atteindre une résolution suffisante pour une application clinique. Une étude plus poussée de la résolution maximale atteinte sera proposée page 139.

Nous avons donc montré l'apport d'une mesure du temps de vol moyen sur la précision de localisation d'une inclusion fluorescente dans le cas d'une géométrie de réflexion.

Dans celui d'une géométrie de transmission, l'apport du temps de vol sur la résolution est moindre car le temps de vol n'est plus directement relié à la profondeur de l'inclusion. Cet apport a néanmoins été validé et évalué précisément dans le cadre de la thèse de Nicolas Ducros [70].

Pour localiser l'inclusion avec la plus grande résolution possible, nous devons déterminer le type de système offrant la meilleure précision de mesure de l'intensité et du temps de vol moyen. Nous allons donc dresser un *état de l'art des systèmes de mesure optique résolus en temps* et de leur *utilisation pour localiser des inclusions fluorescentes*.

1.5 Systèmes optiques capables de mesurer l'intensité et le temps de vol moyen

Il existe trois types de systèmes capables de réaliser ce type de mesure avec une précision temporelle suffisante pour localiser une inclusion dans un tissu épais. Pour chacun d'entre eux, nous allons brièvement rappeler son *principe de fonctionnement* et montrer les situations de sa *mise en œuvre* pour localiser des inclusions fluorescentes.

1.5.1 Systèmes basés sur un mono-détecteur et une carte de comptage TCSPC

Ce type de système est largement plus répandu que ceux utilisant des caméras intensifiées, et depuis très longtemps car elles servent couramment pour les mesures de radioactivité. La figure 1.3 montre son principe de fonctionnement.

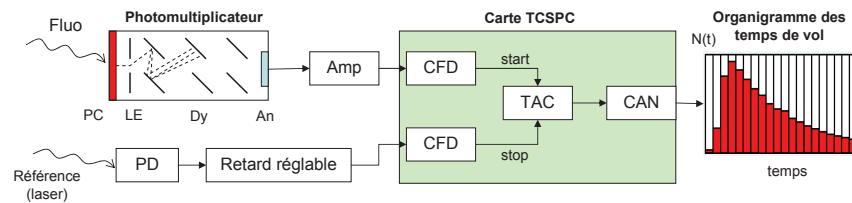


FIGURE 1.3 – Schéma d'un système reposant sur une détection par photomultiplicateur et sur une carte de comptage résolue en temps TCSPC.

Ces systèmes comprennent généralement autant de détecteurs que de points de mesure, un dispositif d'amplification et une ou plusieurs cartes TCSPC. Les détecteurs

peuvent être des photomultiplicateurs, des photodiodes à avalanche (SPAD), où même éventuellement des galettes de micro-canaux (MCP). Lorsqu'un photon de fluorescence provenant du tissu étudié heurte la photocathode (PC) du détecteur, un électron est généré, avec une probabilité correspondant au rendement quantique de la photocathode η . Chaque électron génère une gerbe d'électrons collectée par une anode. Cette impulsion électronique est amplifiée et envoyée dans une carte TCSPC.

Dans cette carte, un discriminateur à fraction constante (CFD) élimine les impulsions d'amplitude insuffisante. Chaque impulsion sélectionnée déclenche le « start » d'un convertisseur temps-amplitude. Une rampe de tension est alors générée jusqu'à la réception d'un signal « stop » provenant de la référence (le laser). L'amplitude de la rampe est donc proportionnelle à l'écart entre les signaux « start » et « stop ». Un convertisseur analogique numérique (CAN) transforme cette amplitude en un mot de 12 bits, ce qui permet de classer le photon détecté dans l'un des 4095 canaux temporels. Chaque nouveau photon détecté incrémente l'un des canaux temporels en fonction de son temps de vol et on obtient, après un nombre d'événements suffisant (typiquement 10^6 coups) un histogramme représentatif de la distribution temporelle du signal de fluorescence.

Utilisation d'un système TCSPC pour localiser des inclusions fluorescentes.

Un système destiné à l'imagerie du petit animal a été développé par la société Advanced Research Technologies (ART, Canada). Son originalité vient du déplacement de l'objectif qui autorise un balayage simultané du point source et du point de détection. Ce dispositif présente l'avantage considérable de ne nécessiter qu'un seul détecteur et qu'une seule carte de comptage, tout en autorisant un balayage complet du petit animal, comme le ferait un scanner de compact disc par exemple. On notera également que ce système est en géométrie de réflexion.

Ce dispositif, malgré son originalité, souffre d'un inconvénient : la distance entre la source et le détecteur est toujours la même, ce qui limite la profondeur d'investigation. En effet, il est souvent admis que lorsque la distance entre source et détecteur est courte, le signal prédominant est celui provenant des couches de faible profondeur. Dans le cas où cette distance est plus grande, on peut au contraire accéder à des informations sur les tissus profonds.

Plus récemment, un autre système préclinique développé conjointement par l'Université de Taijin, le Laboratoire d'Imagerie et de Neurosciences Cognitives (Université de Strasbourg/CNRS) et une université japonaise [72], permet une localisation d'inclusion fluorescente couplée à une mesure de durée de vie. Ce système a été validé sur fantôme en géométrie « slab ».

Une équipe du Polytechnico de Milan [73] propose un système de mammographie présentant la particularité d'acquérir simultanément le signal de fluorescence en réflexion et en transmission. Ceci est rendu possible par deux ensembles de détection coaxiaux comprenant chacun une lentille et un photomultiplicateur, et placés de part et d'autre du milieu diffusant, de géométrie « slab ». Une translation de cet ensemble de détection permet de balayer la totalité de l'échantillon. Toutefois, des essais réalisés sur fantôme ont permis de quantifier la résolution de ce dispositif à 3 mm pour une épaisseur de 2 cm, ce qui ne constitue guère une amélioration par rapport aux résultats obtenus en

continu.

1.5.2 Systèmes basés sur une caméra rapide intensifiée (HRI)

La figure 1.4 montre le principe de fonctionnement d'une caméra rapide intensifiée.

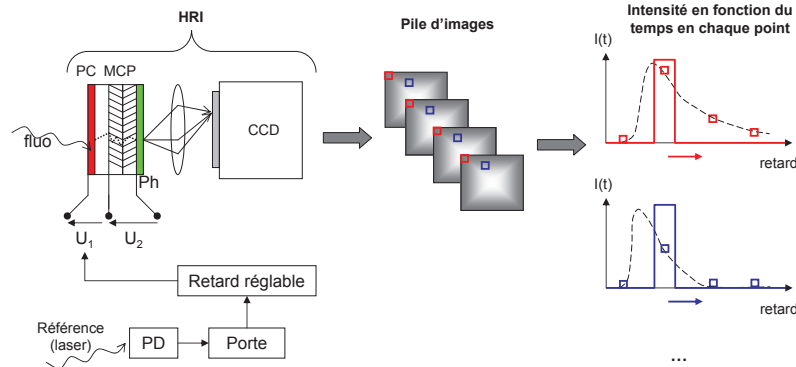


FIGURE 1.4 – Mesure d'une distribution temporelle à l'aide d'une caméra rapide intensifiée (HRI).

Celle-ci est composée d'une galette de micro-canaux (MCP), d'un écran de phosphore (Ph) d'une optique et d'une caméra CCD. Le MCP est constitué d'une matrice de capillaires en verre, montés en parallèle et formant un disque mince. Chaque canal, de diamètre compris entre 6 et 20 microns, se comporte comme un photomultiplicateur. Les gerbes d'électrons créées dans les différents canaux sont transformées en photons visibles sur l'écran de phosphore. Cette image est alors numérisée par une caméra CCD qui est reliée à l'écran par un « taper » de fibres, ou par un système optique.

Pour obtenir une information sur le temps d'arrivée des photons, la tension entre la photocathode et le MCP est activée pendant un intervalle de temps typique de 300 ps. Durant cet intervalle de temps, les électrons générés par la photocathode sont amplifiés. En dehors, le champ électrique n'est pas suffisant pour les arracher à la photocathode. En jouant sur un dispositif de retard électronique entre le signal de synchronisation (laser) et la tension appliquée à la porte, on peut balayer l'axe du temps, et acquérir des images en différents points de celui-ci. On peut ainsi obtenir, pour chaque pixel de l'image, une distribution temporelle du signal mesuré.

Certains constructeurs de HRI proposent, en plus d'un mode de fenêtrage conventionnel, un autre mode d'utilisation appelé « GOI » (pour « Gated Optical Imager ») permettant de réduire la largeur de la porte. Typiquement, dans ce mode, on peut restreindre la fenêtre à 50 ps, mais c'est au détriment de la cadence d'acquisition qui passe de 100 MHz à seulement 1 MHz.

Utilisation d'une caméra rapide intensifiée pour localiser des inclusions fluorescentes.

Un système préclinique a été développé en 2008 par l'université de Harvard [34]. La caméra rapide est composée d'un bloc HRI et d'une caméra CCD séparée. L'originalité

de ce dispositif utilisé en géométrie de transmission est de permettre des mesures de durée de vie de fluorescence. En effet, la méthode consiste à comparer les distributions temporelles mesurées avec un modèle de déclin à plusieurs exponentielles. Puis, les temps de déclin de fluorescence obtenus sont utilisés comme données d'entrée pour la reconstruction du rendement de fluorescence dans le tissu. Ce système n'a toutefois pas été utilisé pour des mesures sur des tissus de plus grande épaisseur.

Un deuxième système basé sur une caméra rapide intensifiée a été développé en 2009 par le Polytechnico de Milan [74]. Ce système, fonctionne en transmission et en géométrie cylindrique. La distribution temporelle est obtenue en réglant le retard de la porte à quatre valeurs différentes. Les auteurs reconnaissent qu'il serait préférable de réaliser un plus grand nombre de points de mesure temporels, mais ne précisent pas le nombre optimal.

Une équipe de la Washington University School of Medicine a récemment développé un tomographe pour le petit animal permettant de mesurer des durées de vie de fluorescence [75]. Tenant compte des essais précédents, il a retenu un système de caméra rapide intensifiée et une géométrie d'acquisition en transmission qui permet d'obtenir des mesures « plus rapides et plus flexibles ». La méthode de localisation est en revanche basée sur une analyse fréquentielle des signaux temporels, et notamment au déphasage entre la lumière laser et le signal de fluorescence détecté. Cette méthode, si elle permet de simplifier la durée d'acquisition, comporte une perte d'information temporelle par rapport à la mesure d'une distribution complète.

Les laboratoires utilisant une caméra rapide intensifiée sont toujours très actifs : en 2010, un nouveau système, basé sur un éclairage pulsé et structuré spatialement a été proposé par le Rensselaer Polytechnic Institute pour l'application au petit animal [76].

En résumé les systèmes dédiés à la mesure de fluorescence basés sur un HRI ont tous été appliqués à des tissus de faible épaisseur (petit animal), le plus souvent en géométrie de transmission. Les acquisitions sont effectuées avec une fenêtre temporelle de largeur minimale et un nombre de point de mesure temporels fixé arbitrairement. Nous verrons qu'il est possible d'optimiser ces paramètres.

Systèmes hybrides MCP/TCSPC.

On notera également l'existence de systèmes composés d'un MCP spécial dont l'anode est composée de plusieurs segments indépendants. Chaque segment de l'anode est relié à une chaîne de comptage, ce qui permet de réaliser des mesures en plusieurs points à partir d'un seul détecteur. C'est le cas, par exemple, du système MONSTIR [77] consacré à l'imagerie endogène du cerveau prématuré et développé par l'University College of London (UCL). Dans ce système, la détection est réalisée par 4 MCP possédant chacun 8 anodes pour un total de 32 points de détection. Les 32 signaux sont analysés par 32 chaînes de comptage indépendantes composées d'un pré-amplificateur, d'un discriminateur à fraction constante et d'un analyseur de temps de précision 1 ps. On notera que dans ce système, les auteurs n'utilisent pas la possibilité de piloter la tension du MCP pour réaliser un fenêtrage temporel. Cette solution, bien qu'elle permette 32 points de mesure, se rapproche plus des solutions combinant photomultiplicateurs et cartes TCSPC que d'une solution HRI puisque le fenêtrage temporel est délaissé au profit d'une carte TCSPC.

1.5.3 Caméras à balayage de fente

Les caméras à balayage de fente, ou « streak cameras », sont le troisième type de détecteur pouvant réaliser des mesures résolues en temps. Elles comportent en entrée une photocathode transformant les photons en électrons. Chaque photo-électron généré est accéléré, puis passe entre deux plaques créant un champ électrostatique modulé en accord avec la périodicité du signal. Les électrons sont déviés par ce champ avec un angle dépendant de leur temps de vol. Un écran de phosphore renvoie une image dont l'un des axes correspond aux temps de vol. L'autre axe peut permettre d'observer plusieurs points de détection simultanément, ou encore de réaliser des mesures spectrométriques, en insérant un objet diffractant dans le chemin optique.

Plusieurs publications [78, 79, 80] ont montré l'intérêt de ce type de détecteur pour la tomographie. Elles permettent en effet de réaliser simultanément une mesure spectrale et temporelle. Toutefois, leur prix très élevé et leur difficulté de mise en œuvre (calibration temporelle notamment) ont pour l'instant limité leur emploi à des preuves de concepts.

1.6 Problématique : quel système pour localiser avec précision et en profondeur une inclusion fluorescente ?

Au cours de cette étude bibliographique, nous avons constaté que les auteurs proposent des systèmes basés sur l'un des deux systèmes « phares » de la mesure résolue en temps : caméra HRI ou chaîne TCSPC. Les articles cités proposent une caractérisation poussée de la solution instrumentale proposée, notamment son bruit, sa sensibilité et sa reproductibilité. Toutefois, ils argumentent rarement sur le choix de tel système plutôt que de tel autre. Ils ne précisent pas le lien entre la résolution temporelle du détecteur, sa sensibilité et la précision de localisation des inclusions fluorescentes.

Certains [72, 81, 82] estiment que les systèmes basés sur un ou plusieurs photomultiplicateurs et cartes TCSPC sont plus sensibles et mieux résolus que ceux basés sur des caméras rapides intensifiées. Leur argumentation repose sur la largeur des canaux temporels dans lesquels sont triés les photons (typiquement de 1 ps) qui est plus étroite que la largeur de porte du HRI. Ceux-ci considèrent que les caméras rapides intensifiées doivent être réservées aux applications nécessitant un nombre important de points de détection, ou du moins, une mesure simultanée en chacun de ces points.

D'autres [34, 74, 77], estiment au contraire que les caméras rapides intensifiées offrent une meilleure résolution temporelle que les photomultiplicateurs individuels. Ils se basent pour cela sur la mesure de l'IRF des galettes de micro-canaux dont la largeur typique, 60 ps, est nettement plus fine que celle des PMT rapides (typiquement 150 ps).

Nous allons donc chercher à déterminer *quel système (HRI ou TCSPC) permet de réaliser les mesures d'intensité et de temps de vol moyen les plus précises*. Pour cela, nous tâcherons de répondre aux deux questions suivantes :

1. Quelle *sensibilité* peut offrir chacune des deux chaînes de mesure ? La sensibilité est importante à deux titres : d'une part elle détermine la précision de mesure de l'intensité, mais également la profondeur d'investigation. Nous verrons en outre qu'elle a également un impact sur la précision de mesure du temps de vol moyen et donc la résolution suivant Z.
2. Quels sont les *critères instrumentaux* qui déterminent la *précision de mesure du temps de vol moyen* ? S'agit-il de la largeur de l'IRF du détecteur - ce qui irait en faveur des solutions de type HRI - ou bien de la finesse des canaux temporels apportés par la solution TCSPC ? Comment la largeur de la fenêtre temporelle du HRI influe-t-elle sur la précision de mesure du temps de vol ?

Après avoir apporté une réponse à ces questions, nous tâcherons de déterminer les *paramètres d'acquisition optimaux* en fonction de l'application visée.

Enfin, nous montrerons comment ces résultats peuvent être mis en pratique pour réaliser le détecteur optimal répondant à une problématique clinique concrète : l'amélioration du diagnostic du cancer de la prostate par tomographie optique résolue en temps.

Chapitre 2

Comparaison de la sensibilité d'un HRI et d'une chaîne TCSPC

Nous définissons la *sensibilité* comme la capacité de la chaîne à restituer les événements mesurés (intensité lumineuse mesurée ou photons comptés) indépendamment du bruit éventuellement généré par la mesure.

Il n'est pas aisé de comparer la sensibilité de ces deux chaînes, car l'une fonctionne en mode de comptage, alors que l'autre se rapproche d'une mesure analogique. Le niveau de gris obtenu sur une image prise par un HRI est en effet proportionnel au nombre de photons collectés, mais ne correspond pas à un photo-événement discret. Pour comparer la sensibilité des deux chaînes de mesure, nous retenons comme critère le *rendement quantique* (nombre moyen d'électrons générés à partir d'un photon incident) et la *défectivité* (flux minimum détectable compte-tenu des diverses sources de bruit).

2.1 Évaluation de la sensibilité de la chaîne de comptage TCSPC

2.1.1 Chaîne TCSPC utilisée pour la comparaison

Pour caractériser la sensibilité de la chaîne TCSPC, nous avons mis en place un banc comprenant un laser femto-seconde et quatre voies de détection TCSPC.

La source de lumière est un laser titane-saphir produisant des pulses de 150 fs à une cadence de 80 MHz. La longueur d'onde est réglée à 775 nm. La puissance en sortie de fibre est atténuée jusqu'à atteindre une valeur moyenne de 30 mW correspondant à l'Exposition Maximale Permise (EMP) cutanée définie par la norme européenne NF-EN-60825-1/A2. La lumière laser est injectée dans une fibre d'excitation dont l'extrémité est positionnée en face d'une des six fibres d'excitation au moyen d'une platine motorisée. La lumière de fluorescence est alors prélevée dans le milieu par quatre fibres optiques en plastique (diamètre intérieur 1 mm) puis filtrée à l'aide d'un filtre Notch, d'un filtre interférentiel et d'un filtre coloré. La détection est réalisée par quatre photomultiplicateurs rapides (Hamamatsu H5773-20) équipés de photocathodes S20 (sodium-potassium-antimoine-césium) dont le choix répond à un compromis

entre résolution temporelle et sensibilité dans le proche infrarouge. La sortie des photomultiplicateurs est connectée à une carte TCSPC 4 voies (Becker&Hickl SPC-134). La figure 2.1 montre le dispositif expérimental.

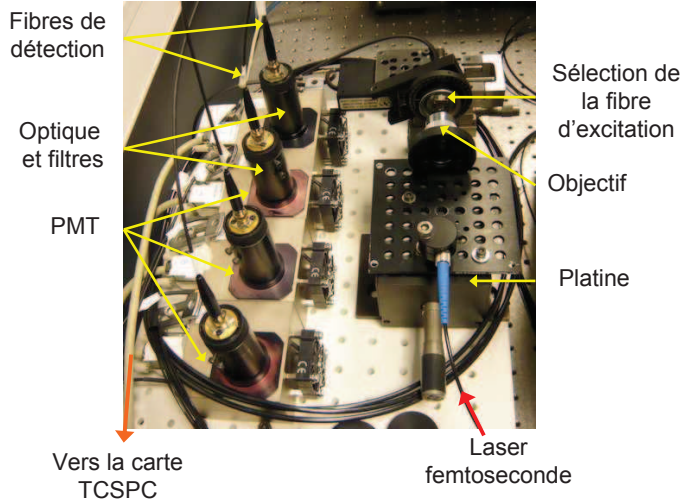


FIGURE 2.1 – Chaîne TCSPC à quatre voies utilisée pour notre comparaison de la sensibilité.

2.1.2 Rendement quantique

Le rendement quantique η du photomultiplicateur peut être déduit simplement de la sensibilité de la photocathode ($S_C = 78 \text{ mA/W}$ étalonnée en usine par le constructeur). La relation liant S_C à η est la suivante : $S_C = \eta \times \frac{\lambda \cdot e}{h \cdot c}$.

Après application d'un facteur correctif dû à la longueur d'onde, on obtient le rendement quantique à 800 nm :

$$\eta = 0,029 \quad (2.1)$$

Par conséquent, *seulement 3% des photons incidents génèrent une impulsion électrique en sortie du photomultiplicateur*. Nous avons également estimé le nombre de photo-événements perdus en raison du système de comptage TCSPC à 10%, ce qui amène l'efficacité de comptage du système TCSPC à 2,6%.

2.1.3 Détectivité

On définit la détectivité comme le plus faible flux pouvant être détecté par la chaîne de comptage. On peut l'estimer en calculant le flux lumineux qui serait nécessaire pour générer un signal équivalent au niveau du bruit de la mesure. Le courant d'obscurité étant un phénomène non aléatoire, il peut être soustrait au signal et ne limite donc pas la sensibilité. On s'intéresse donc exclusivement à sa composante aléatoire : *le bruit d'obscurité*.

Pour l'évaluer, nous mesurons l'écart type sur le nombre de coups mesurés par le photomultiplicateur dans le noir complet. La détectivité d s'obtient en corrigeant cet écart type du rendement quantique η , ce qui donne : $d = 266 \text{ photons/s}$.

2.2 Évaluation de la sensibilité du HRI

2.2.1 Banc HRI utilisé pour la comparaison

Pour comparer objectivement les deux bancs, la source de lumière pulsée est identique à celle qui est utilisée pour la caractérisation du TCSPC. De plus, leurs photocathodes sont constituées du même matériau (type S20).

Le banc HRI (figure 2.2) est composé d'un MCP et de son écran de phosphore (Kentech Instruments), ainsi que d'une caméra CCD identique à celle que nous avons utilisée en tomographie continue, dont la caractérisation figure page 147. L'image formée par l'intensificateur sur l'écran de phosphore est reprise par un système optique de grandissement unitaire comme le montre la figure 100. Les autres composants du système sont identiques à ceux de la chaîne TCSPC.

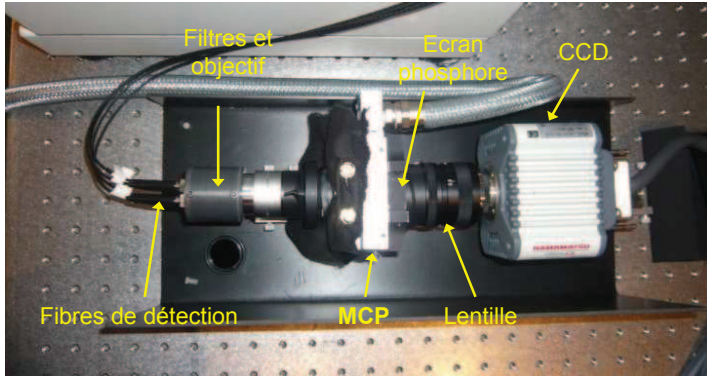


FIGURE 2.2 – Photographie du banc d'imagerie par caméra rapide intensifiée (HRI) utilisé pour notre comparaison de la sensibilité.

2.2.2 Rendement quantique du HRI

Contrairement au photomultiplicateur, la sensibilité de la photocathode du HRI n'a pas été étalonnée en usine. Il est néanmoins possible de déterminer le rendement quantique en nous basant sur une approche statistique similaire à celle qu'on utilise pour déterminer le gain électronique d'une caméra. En effet, si m est l'intensité mesurée par un pixel de la caméra (exprimée en niveaux de gris) pour un certain flux lumineux incident ϕ , alors on peut écrire :

$$m = \eta \cdot q \cdot \phi \quad (2.2)$$

avec η le rendement quantique de la photocathode, et q le gain électronique exprimé en niveaux de gris par photoélectrons.

Si l'on prend la variance des deux termes de l'équation 2.2, on obtient :

$$\text{var}(m) = q^2 \text{var}(\eta \cdot \phi) \quad (2.3)$$

$\eta \cdot \phi$ correspondant aux photoélectrons générés par la photocathode, sa variance vaut $\eta \cdot \phi$ dans le cas d'un bruit poissonnien. On obtient donc :

$$\text{var}(m) = q^2 \cdot \eta \cdot \phi \quad (2.4)$$

De la combinaison des équations 2.2 et 2.4, nous déduisons l'expression du gain électronique du HRI :

$$q = \frac{\text{var}(m)}{m} \quad (2.5)$$

q peut donc être obtenu expérimentalement en faisant varier le flux lumineux de manière à tracer la droite $\text{var}(m)$ en fonction de m et en calculant son coefficient directeur. Le rendement quantique du HRI peut alors être obtenu à partir d'un point quelconque de cette droite, grâce à la relation :

$$\eta = \frac{m}{q \cdot \phi} \quad (2.6)$$

Pour évaluer expérimentalement le rendement quantique du HRI, nous mesurons sa réponse à un flux lumineux généré à l'aide du dispositif de caractérisation décrit page 147. Le coefficient directeur de la droite $\text{var}(m) = f(m)$ nous permet de déduire $q \approx 1$. Pour remonter à la valeur de η , nous devons convertir le flux lumineux généré au niveau de la photocathode en photons par pixel et par seconde. A l'aide d'un puissancemètre et connaissant le grandissement du système (0,0331 mm/pixel), nous déduisons le flux lumineux correspondant à chaque pixel :

$$N = 6,31 \cdot 10^4 \text{ photons} \cdot \text{s}^{-1} \quad (2.7)$$

A ce flux correspond un signal de 1820 niveaux de gris pendant 100 ms, soit $m = 18200 \text{ niveaux} \cdot \text{s}^{-1}$. A l'aide de l'équation 2.6, on en déduit le rendement quantique du MCP :

$$\eta \approx 3\% \quad (2.8)$$

Le rendement quantique du MCP est donc très proche de celui du photomultiplicateur de la chaîne TCSPC, ce qui est cohérent avec la composition chimique similaire de leurs photocathodes respectives. Toutefois, la conversion électrons-photons qui a lieu dans l'écran de phosphore dégrade le rendement global de la chaîne, ce qui augmente l'influence du bruit photonique, comme nous le verrons page 2.2.4.

2.2.3 Proportion de photons non comptabilisés par le fenêtrage temporel

Dans la section précédente, nous avons caractérisé la sensibilité du HRI à l'aide d'une source de lumière continue, et pour une fenêtre temporelle de largeur infinie, c'est à dire ouverte en permanence. Or, pour obtenir une distribution temporelle d'un

signal de fluorescence généré par un laser impulsionnel, on n'intègre les photons que pendant un intervalle de temps L compris entre 50 et 500 ps pour chaque cycle du laser. Par conséquent, une partie des photons « utiles » n'est pas comptabilisée par le système de détection.

Pour évaluer cette perte, nous allons modéliser analytiquement la proportion de photons effectivement inclus dans la porte temporelle de largeur L . Si nous faisons l'hypothèse que la fenêtre temporelle peut être représentée par une fonction « porte » parfaite¹, alors la probabilité $p(L, \Gamma)$ pour qu'un photon atteigne le détecteur dans une porte temporelle de largeur L et de retard Γ s'écrit :

$$p(L, \Gamma) = \int_{-\infty}^{+\infty} N(t) \cdot \text{rect}_L(t - \Gamma) dt \quad (2.9)$$

avec $N(t)$ désignant la densité de probabilité d'arrivée des photons et $\text{rect}_L(t - \Gamma)$ la fonction porte centrée en Γ et de largeur L .

En utilisant la parité de la fonction porte $\text{rect}_L(\Gamma - t) = \text{rect}_L(t - \Gamma)$, l'expression 2.9 correspond à un produit de convolution :

$$p(L, \Gamma) = N \star \text{rect}_L(\Gamma) \quad (2.10)$$

Pour obtenir la distribution temporelle, on fait généralement varier régulièrement le retard Γ . Le nombre de photons N collectés durant ce processus de balayage s'écrit donc :

$$N = \sum_{k=1}^P \phi \cdot t_{exp} \cdot (N \star \text{rect}_L)(k \cdot \delta t) \quad (2.11)$$

avec ϕ le nombre de photons incidents par seconde, t_{exp} le temps d'intégration à chaque point de mesure et δt le pas d'espacement temporel (retard) entre deux mesures.

Si le balayage temporel couvre toutes les valeurs non nulles de la fonction $N \star \text{rect}_L$, alors la somme 2.11 est égale à la somme infinie suivante :

$$N = \sum_{k=1}^{+\infty} \phi \cdot t_{exp} \cdot [N \star \text{rect}_L](k \cdot \delta t) \quad (2.12)$$

En reprenant la formulation intégrale du produit de convolution, on peut écrire :

$$N = \sum_{k=1}^{+\infty} \phi \cdot t_{exp} \cdot \left[\int_{-\infty}^{+\infty} N(t) \cdot \text{rect}_L(t - k \cdot \delta t) dt \right] \quad (2.13)$$

En écrivant l'intégrale suivant t sous la formulation de Riemann, on obtient :

$$N = \sum_{k=1}^{+\infty} \phi \cdot t_{exp} \cdot \left[\sum_{t=1}^{+\infty} N(t) \cdot \text{rect}_L(t - k \cdot \delta t) dt \right] \quad (2.14)$$

1. La validité de cette hypothèse sera montrée page 119.

A l'aide du théorème de Fubini, on peut permuter ces deux sommes :

$$N = \phi \cdot t_{exp} \cdot \sum_{t=1}^{+\infty} N(t) dt \cdot \sum_{k=1}^{+\infty} rect_L(t - k \cdot \delta t) \quad (2.15)$$

La fonction porte est paire et son intégrale est invariante par translation. On peut donc simplifier en :

$$N = \phi \cdot t_{exp} \cdot \sum_{t=1}^{+\infty} N(t) dt \cdot \sum_{k=1}^{+\infty} rect_L(k \cdot \delta t) \quad (2.16)$$

Comme $N(t)$ est une densité de probabilité, la première somme équivaut à une intégrale de valeur 1.

En multipliant le numérateur et le dénominateur de la deuxième somme par δt , on voit apparaître l'intégrale de la fonction $rect_L(k \cdot \delta t)$ suivant k . Cette intégrale vaut L , ce qui permet de déterminer une expression simple du nombre de photons collectés :

$$N = \frac{\phi \cdot t_{exp} \cdot L}{\delta t} \quad (2.17)$$

On peut en déduire que :

- le nombre de photons collectés est proportionnel à la largeur de la porte, *même à l'issue d'un balayage complet*, ce qui n'était pas évident a priori
- ce nombre est également proportionnel au temps d'exposition par point de balayage et inversement proportionnel au pas de déplacement temporel de la porte. Ceci peut s'interpréter de la façon suivante : si le pas de déplacement temporel de la porte est plus fin, le nombre de points de mesure sera plus grand. Le nombre de photons collectés sera donc plus important
- toutefois, cette augmentation du nombre de points de mesure se fera au détriment du temps d'exposition total qui deviendra alors :

$$t_{expo total} = t_{exp} \times \frac{t_{max} - t_{min}}{\delta t} \quad (2.18)$$

avec t_{min} et t_{max} désignant les bornes de la distribution temporelle étudiée.

En combinant les expressions 2.17 et 2.18, on obtient la proportion de photons détectés :

$$\frac{\phi_{détectés}}{\phi} = \frac{N}{t_{expo total} \cdot \phi} = \frac{L}{(t_{max} - t_{min})} \quad (2.19)$$

Ainsi, la proportion de photons détectés par un HRI lors de la mesure d'une distribution temporelle complète correspond *au rapport entre la largeur de la fenêtre L et la plage temporelle sur laquelle cette distribution temporelle s'étend*.

Il s'agit d'un résultat important que nous serons amenés à utiliser fréquemment dans ce chapitre. Il convient donc de s'assurer de la validité de la modélisation précédente et de l'équation qui en découle.

Pour cela, nous réalisons une simulation de la proportion de photons effectivement situés dans une fenêtre temporelle rectangulaire, en nous basant sur les conditions

suivantes : propriétés optiques du sein, inclusion à 1 cm de profondeur, géométrie de réflexion, distance source-détecteur de 1 cm.

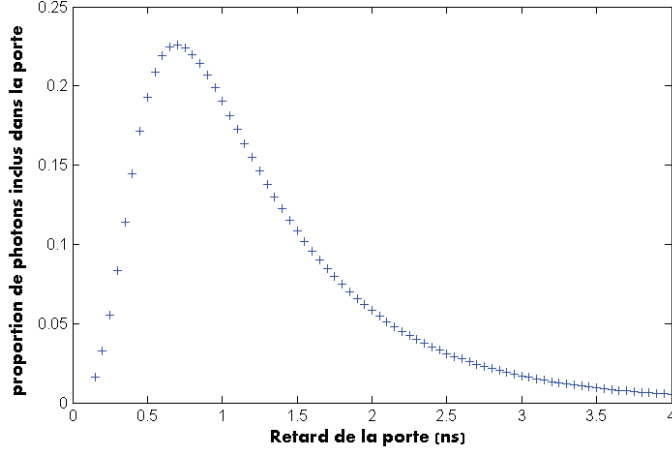


FIGURE 2.3 – Proportions de photons détectables, c'est à dire situés dans la fenêtre temporelle du détecteur, en fonction du retard de cette porte.

La figure 2.3 montre la proportion de photons effectivement situés dans une fenêtre temporelle de largeur 300 ps en fonction du retard Γ . Le choix d'une largeur de 300 ps correspond aux spécifications de la fenêtre temporelle mise en œuvre dans ce chapitre. On reconstruit la distribution temporelle en faisant varier le retard de la porte selon un pas régulier de 50 ps. Nous constatons que dans le meilleur des cas, lorsque le retard correspond au maximum de la distribution temporelle, seulement 25% des photons sont situés dans la fenêtre temporelle. Pour évaluer précisément la proportion de photons effectivement détectés durant la totalité du balayage, nous calculons la moyenne des valeurs de la figure 2.3 :

$$\left(\frac{\phi_{\text{détectés}}}{\phi} \right)_{\text{simulé}} = 0,0748 \quad (2.20)$$

Dans l'exemple précédent, seulement 7,5% de photons sont comptabilisés par le détecteur en raison du fenêtrage. Nous pouvons à présent vérifier la validité de la formule 2.19 sur le cas précédent :

$$\left(\frac{\phi_{\text{détectés}}}{\phi} \right)_{\text{théorique}} = \frac{300}{4000} = 0,075 \quad (2.21)$$

Nous constatons une très bonne correspondance entre la valeur théorique obtenue à l'aide de la formule analytique 2.19 et la simulation, ce qui valide cette équation.

La proportion de photons collectés durant une acquisition complète est indépendante du pas de balayage choisi.

On pourrait penser qu'un pas de balayage temporel plus fin diminue la proportion de photons collectés en multipliant le nombre de points de mesure. La formule 2.19 montre qu'il n'en est rien. En réalité, même si on multiplie le nombre de points de

mesure, la proportion de photons collectés sera uniquement dépendante de la largeur de la porte et de celle de la plage de mesure $t_{max} - t_{min}$.

Pour vérifier cette idée, nous avons simulé la proportion de photons effectivement collectés par une porte pour différents pas de balayage temporel. Le résultat obtenu pour trois largeurs de porte différentes est présenté sur la figure suivante :

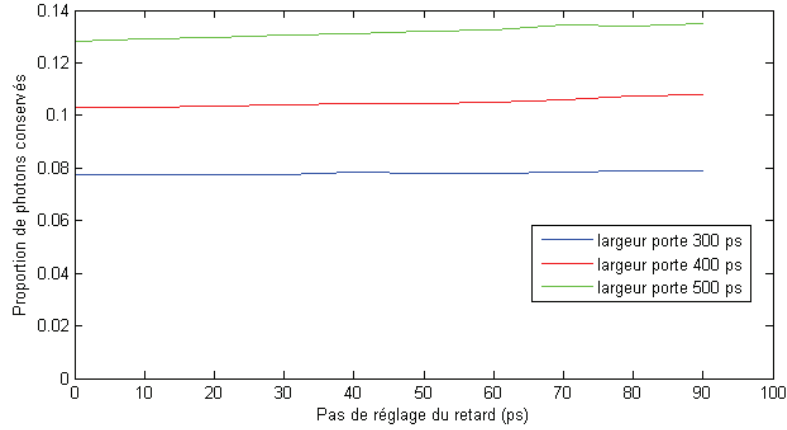


FIGURE 2.4 – Proportion de photons détectés par un HRI en fonction du pas de balayage temporel (retard) pour 3 largeurs de porte temporelle (300, 400 et 500 ps).

Les courbes obtenues sont globalement constantes, ce qui confirme la formule 2.19 page 103. La très faible croissance des courbes s'explique par un effet de bord aux positions où la porte est placée aux extrémités de la distribution temporelle.

On constate également que *la proportion de photons collectés est proportionnelle à la largeur de la porte*, ce qui est également tout à fait en accord avec l'équation 2.19.

2.2.4 Défectivité du HRI

Dans le cas d'un ensemble constitué d'une galette de micro-canaux (MCP), d'un écran de phosphore et d'une caméra CCD, on est en présence d'un plus grand nombre de sources de bruits que dans le cas de la chaîne TCSPC :

1. bruits photoniques liés aux flux lumineux arrivant sur la photocathode et sur la caméra CCD
2. bruits d'obscurité issus de la photocathode et de la caméra CCD
3. bruit électronique lié à la numérisation par la caméra CCD.

Pour évaluer les bruits (2) et (3), nous réalisons une mesure sur une soustraction d'images de noir, obtenues en coupant la source de lumière. En faisant varier le temps d'exposition, on peut distinguer le bruit électronique, invariant, des bruits d'obscurité dont la variance est proportionnelle au temps d'exposition.

La figure 2.5 montre le résultat obtenu en mesurant l'écart type sur la différence entre deux images de noir. On procède ainsi pour éliminer l'influence éventuelle d'une différence de sensibilité spatiale du capteur.

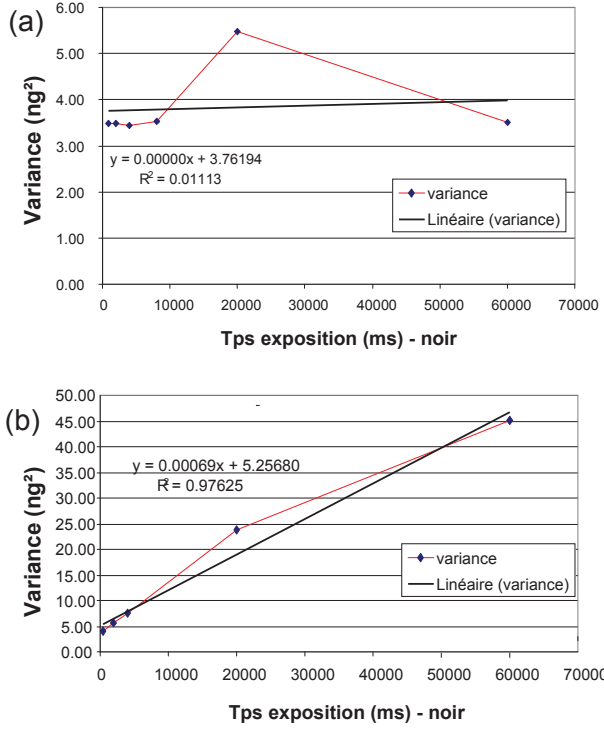


FIGURE 2.5 – Variance mesurée sur la différence entre deux images acquises dans l'obscurité.

(a) représente la courbe obtenue pour la caméra seule (tension du HRI fixée à 0V)
 (b) représente la courbe obtenue pour l'ensemble constitué de la caméra et du MCP réglé à sa tension d'amplification de référence.

La courbe (b) croît plus rapidement que (a), donc le bruit photonique lié au courant d'obscurité du MCP domine celui de la caméra. On estime la variance du courant d'obscurité du MCP à 24 électrons/s. En revanche, l'ordonnée à l'origine de (b) diffère peu de celle de (a), donc le MCP n'augmente pas le bruit de lecture de façon significative. A l'aide des résultats obtenus précédemment, on peut évaluer la détectivité d du HRI (nombre de photons minimum détectables) :

$$d = \frac{\sqrt{24 \cdot t_{\text{expo}} + 5}}{\eta} \times \frac{(t_{\text{max}} - t_{\text{min}})}{L} \quad (2.22)$$

Pour une distribution temporelle typique d'amplitude $t_{\text{max}} - t_{\text{min}} = 4 \text{ ns}$, une largeur de porte de 300 ps et un temps d'exposition par point de 100 ms, cela correspond approximativement à $3540 \text{ photons} \cdot \text{s}^{-1}$.

2.3 Bilan comparatif de la sensibilité des deux systèmes

Nous venons d'évaluer la sensibilité et la détectivité de chacun des deux systèmes. Elles sont résumées dans le tableau suivant :

	chaîne TCSPC	HRI*
Rendement quantique	2,9 %	3 %
Photoévénements comptabilisés	90 %	7,5 %
Détectivité (flux minimum détectable)	266	3540

* valeurs pour une distribution temporelle typique d'amplitude $t_{max} - t_{min} = 4 ns$ et une largeur de porte de 300 ps.

La sensibilité au sens de la conversion photons/électrons est donc identique pour les deux systèmes, et limitée par le seul rendement quantique de la photocathode.

Toutefois, le système de fenêtrage temporel du MCP requis pour remonter à la distribution temporelle diminue la proportion de photons collectés par le HRI dans une proportion qui dépend de l'amplitude de la distribution temporelle mesurée ($t_{max} - t_{min}$) et de la largeur de la porte L . Pour une largeur de fenêtre temporelle typique de 300 ps et une inclusion située à 2 cm de profondeur, le HRI collecte en moyenne quinze fois moins de photo-électrons que la chaîne TCSPC, *ce qui le pénalise pour les applications impliquant un signal de fluorescence très faible*.

Pour améliorer la sensibilité du HRI, nous pouvons envisager d'augmenter la largeur de la porte temporelle L . En diminuant la perturbation induite par le bruit photonique, cela permettrait non seulement d'améliorer la précision de mesure de l'intensité mais aussi celle du temps de vol moyen comme nous le verrons dans le chapitre 3 (voir éq 3.6 page 109).

Cependant, une fenêtre plus large élargirait également la distribution temporelle, ce qui pourrait aussi avoir une conséquence négative sur la précision du temps de vol mesuré. Nous montrerons dans le chapitre 4 qu'il est possible d'optimiser L pour obtenir la meilleure précision possible sur les temps de vols.

Chapitre 3

Comparaison de la précision de mesure du temps de vol moyen déterminé par un HRI et par une chaîne TCSPC

3.1 Distinction entre la résolution temporelle du système et l'incertitude sur la mesure des temps de vol moyens

On caractérise généralement la résolution temporelle d'un système en mesurant sa réponse à un Dirac temporel (IRF pour Impulse Response Function). La largeur à mi-hauteur de l'IRF donne une estimation fiable de la résolution temporelle. Toutefois, nous allons montrer que *l'IRF ne constitue pas une limite à la précision de mesure des temps de vol moyens*.

Dans un premier temps, nous allons donc analyser les sources d'incertitude sur la mesure du temps de vol moyen. Nous verrons que ces sources ne sont pas les mêmes selon que la mesure temporelle est réalisée par un système TCSPC ou par une fenêtre temporelle, ce qui est le cas de la caméra rapide intensifiée.

Afin de comparer les deux systèmes dans des conditions équivalentes, nous fixons comme paramètre constant le nombre de photons reçus N pendant le temps d'acquisition de la totalité de la distribution temporelle. Dans le cas de la caméra rapide intensifiée, N correspond à la somme des photons reçus pour chaque point de mesure.

3.2 Incertitude de mesure des temps de vols par chaîne de comptage TCSPC

Nous cherchons donc à évaluer l'amplitude de la dispersion statistique sur la mesure du temps de vol moyen par une chaîne de comptage TCSPC. Chaque photon détecté est trié dans un canal temporel t_i . Après un certain temps d'acquisition, l'expérimentateur obtient un histogramme composé de N_i photons rangés dans des canaux temporels

t_i . La formule du calcul du temps de vol moyen pour une distribution continue (voir équation 1.1 page 87) prend donc la forme discrète de l'équation 3.1 :

$$\langle t \rangle = \frac{\sum_{i=1}^K N_i \times t_i}{\sum_{i=1}^K N_i} \quad (3.1)$$

avec N_i le nombre de photons compté dans le canal temporel , et K le nombre de canaux temporels.

Pour simplifier, on notera $N = \sum_{i=1}^K N_i$ le nombre total de photons comptés.

Pour déterminer l'expression de la variance de $\langle t \rangle$ en fonction de l'incertitude sur le nombre de photons collectés dans chaque canal, on utilise la loi de propagation des incertitudes 3.2. La variance d'une fonction $f(x_1, x_2, \dots, x_n)$ de n variables aléatoires x_i est donnée par :

$$\sigma_f^2 = \sum_1^n \left(\frac{\partial f}{\partial x_i} \right)^2 \sigma_{x_i}^2 + 2 \sum_{i=1}^{n-1} \sum_{j=i+1}^n \frac{\partial f}{\partial x_i} \cdot \frac{\partial f}{\partial x_j} \cdot \text{cov}(x_i, x_j) \quad (3.2)$$

Pour appliquer la formule 3.2 au temps de vol défini par l'équation 3.1, on doit évaluer la dérivée partielle de $\langle t \rangle$ suivant N_i :

$$\frac{\partial \langle t \rangle}{\partial N_i} = \frac{t_i \cdot \left(\sum_{i=1}^K N_i \right) - \left(\sum_{i=1}^K N_i \times t_i \right) \cdot 1}{\left(\sum_{i=1}^K N_i \right)^2} = \frac{t_i - \langle t \rangle}{N} \quad (3.3)$$

En appliquant la formule 3.2 avec les dérivées partielles données par 3.3, on obtient :

$$\sigma_{\langle t \rangle}^2 = \frac{1}{N^2} \sum_{i=1}^K ((t_i - \langle t \rangle) \sigma_{N_i})^2 \quad (3.4)$$

Dans l'hypothèse d'un bruit gaussien, l'écart type du nombre de photons comptabilisés dans le canal temporel d'indice i s'écrit : $\sigma_{N_i} = \sqrt{N_i}$. D'où :

$$\sigma_{\langle t \rangle}^2 = \frac{1}{N} \sum_{i=1}^K \frac{N_i (t_i - \langle t \rangle)^2}{N} \quad (3.5)$$

Or, $\sum_{i=1}^K \frac{N_i (t_i - \langle t \rangle)^2}{N}$ correspond à l'écart moyen entre le temps d'arrivée des photons et le temps de vol moyen. Cet écart moyen est proportionnel à la largeur de la distribution temporelle des temps de vol. Pour simplifier les calculs, nous la noterons ΔT . L'incertitude sur la mesure des temps de vol par une chaîne TCSPC prend donc la forme donnée par l'équation :

$$\sigma_{\langle t \rangle}^2 = \frac{\Delta T^2}{N} \quad (3.6)$$

Influence de l'IRF du système TCSPC sur l'incertitude de mesure des temps moyens

Nous avons vu que la méthode de localisation prend en compte l'écart entre le temps de vol moyen du signal de fluorescence et celui du signal de diffusion : $t_{sd} = t(U_{sd}^m) - t(U_{sd}^x)$ (voir page 90). Cette approche nous dispense de mesurer l'IRF du système pour corriger les erreurs systématiques (offset) dues au délai de propagation dans les fibres optiques et dans le détecteur. Par conséquent, les seules sources d'incertitude sur la mesure du temps de vol moyen sont celles qui mettent en jeu des phénomènes aléatoires.

L'incertitude sur t_{sd} correspond à la somme quadratique des incertitudes sur le temps de vol de fluorescence et celui de diffusion. Nous en déduisons que l'incertitude sur la mesure du temps de vol d'un photon unique s'écrit :

$$\sigma_{<t>}^2 = (\sigma_{propagation}^2 + \sigma_{système}^2)_{fluorescence} + (\sigma_{propagation}^2 + \sigma_{système}^2)_{diffusion} \quad (3.7)$$

Le terme $\sigma_{propagation}^2$ dépend des caractéristiques physiques du milieu, de la profondeur de l'inclusion et du déclin de fluorescence dans le cas de la mesure de fluorescence.

$\sigma_{système}^2$ correspond à la distribution statistique des temps d'arrivée des photons due au système de mesure. Il s'agit donc de la résolution temporelle du système. Celle-ci est caractérisée par la largeur de l'IRF de l'instrument qui entraîne un élargissement de la distribution temporelle des photons autour du temps moyen. L'écart au temps moyen mesuré pour chaque signal (fluorescence et diffusion) devient donc :

$$\Delta T_{mesuré}^2 = \Delta T_{propagation}^2 + \Delta T_{IRF}^2 \quad (3.8)$$

Étant donné qu'on ne s'intéresse pas au temps d'arrivée d'un photon unique mais de N photons dont on mesure le temps moyen, l'incertitude sur la mesure du temps de vol moyen devient donc :

$$\sigma_{<t>}^2 = \left(\frac{\Delta T_{propagation}^2 + \Delta T_{IRF}^2}{N_{fluo}} \right)_{fluo} + \left(\frac{\Delta T_{propagation}^2 + \Delta T_{IRF}^2}{N_{diff}} \right)_{diffusion} \quad (3.9)$$

Dans la plupart des cas, le nombre de photons collectés pour la diffusion peut être rendu considérablement supérieur à celui collecté pour la fluorescence (l'écart typique est compris entre 5 et 7 ordres de grandeur). De plus, comme la distance parcourue par la lumière de diffusion est plus courte que celle du signal de fluorescence, on peut simplifier en :

$$\sigma_{<t>}^2 = \frac{\Delta T_{propagation}^2 + \Delta T_{IRF}^2}{N_{fluo}} \quad (3.10)$$

Le détecteur élargit donc la distribution temporelle mesurée sous la forme d'une somme quadratique des écarts au temps moyen. Tout l'enjeu de notre analyse va consister à comparer l'importance relative de ΔT_{IRF}^2 et $\Delta T_{propagation}^2$ pour déterminer si l'instrument est bien dimensionné.

3.3 Application au cas concret du photomultiplicateur H5773

Pour déterminer le ΔT_{IRF}^2 de la chaîne PMT et TCSPC mis en œuvre dans ce chapitre, on se base sur la réponse à une impulsion laser de 150 fs. La figure 3.5 montre la distribution temporelle obtenue, dont la largeur à mi-hauteur est estimée à 152 ps.

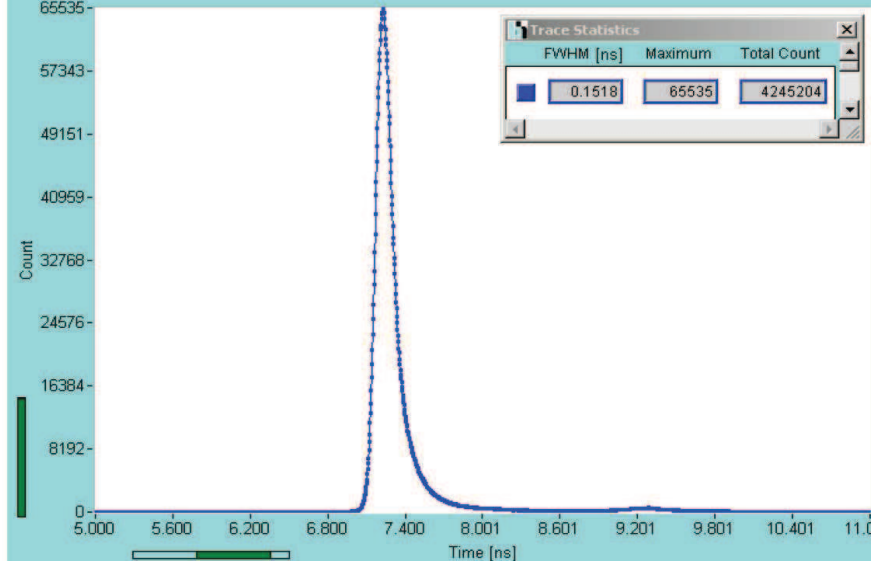


FIGURE 3.1 – Évaluation de la largeur à mi-hauteur de la réponse du système comprenant PMT (H5773, Hamamatsu) et carte de comptage TCSPC à une impulsion de 150 fs.

L'écart au temps moyen ΔT_{IRF} peut être simplement déduit de la largeur à mi-hauteur H en se basant sur l'hypothèse d'une loi Normale pour laquelle on peut écrire : $H = 2\sqrt{2\ln(2)}\Delta T_{IRF} \approx 2,35\Delta T_{IRF}$, soit : $\Delta T_{IRF} \approx 65 ps$.

Pour comparer et évaluer l'influence de cet écart sur une mesure réelle, nous mesurons la distribution temporelle provenant d'une inclusion fluorescente située à 1 cm de profondeur dans un milieu simulant les propriétés optiques du sein et pour une distance source-détecteur de 1 cm.

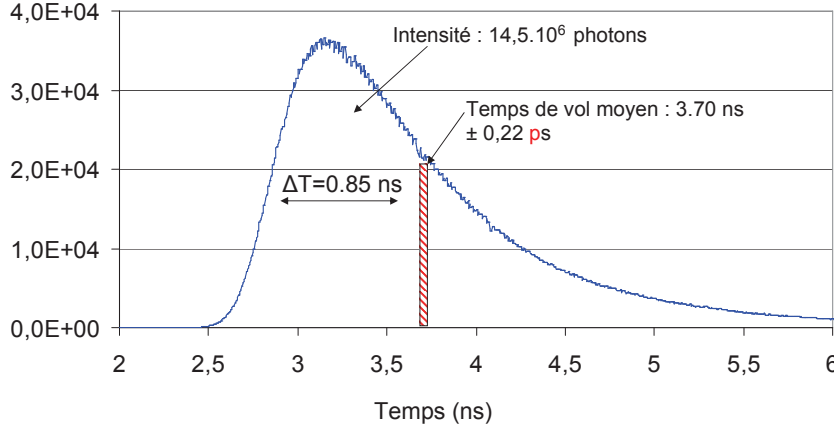


FIGURE 3.2 – Distribution temporelle du signal de fluorescence provenant d’une inclusion située à 1 cm de profondeur pour un espace entre source et détecteur de 1 cm dans un milieu simulant les propriétés optiques du sein.

La figure 3.2 montre la distribution temporelle mesurée par l’un des photomultiplicateurs et une carte TCSPC du système décrit page 98. À l’aide de cette distribution, on détermine précisément l’écart $\Delta T_{mesuré}$ des photons au temps moyen :

$$\Delta T_{mesuré} = 850 \text{ ps} \quad (3.11)$$

À l’aide de la relation 3.8, on déduit l’écart au temps moyen dû à la propagation dans le milieu :

$$\Delta T_{propagation} = \sqrt{\Delta T_{mesuré}^2 - \Delta T_{IRF}^2} = 847 \text{ ps} \quad (3.12)$$

On constate donc que dans cet exemple, *l’incertitude de l’instrument contribue pour seulement 0,35% à l’écart au temps moyen !* Il est donc tout à fait possible de la négliger dans ce cas précis.

L’équation 3.6 page 109 va nous permettre de déterminer l’incertitude sur la mesure du temps de vol moyen. Pour la distribution temporelle de la figure 3.2, le nombre total de photons comptés pendant une minute s’élève à : $N = 14,5.10^6$ photons, soit un flux de photons incident $\phi = N / (\eta \cdot t_{expo total}) = 8.10^6 \text{ photons.s}^{-1}$. L’écart type sur la mesure du temps de vol moyen vaudra donc :

$$\sigma_{<t>} = \frac{\Delta T_{mesuré}}{\sqrt{N}} = 0,22 \text{ ps} \quad (3.13)$$

Cette incertitude sur la mesure du temps de vol moyen est donc excellente en comparaison avec la résolution temporelle du système qui est seulement de 65 ps ! Si l’on se base uniquement sur le temps de vol moyen pour déterminer la profondeur de l’inclusion, alors la résolution obtenue suivant l’axe Z vaut :

$$\sigma_z = \frac{\nu \times \sigma_{<t>}}{2} = 1,7 \text{ } \mu\text{m} \quad (3.14)$$

Dans le cas où l'on ne fixe pas de limite au nombre de photons utilisés pour réaliser la distribution temporelle, l'erreur de localisation dans une chaîne TCSPC est donc très faible. On peut généraliser ce résultat en écrivant l'incertitude sur le temps de vol moyen pour un flux de photons incidents ϕ quelconque :

$$\sigma_{<t>} = \frac{\Delta T_{mesuré}}{\sqrt{\eta \cdot \phi \cdot t_{expo total}}} \quad (3.15)$$

avec η le rendement quantique du détecteur et $t_{expo total}$ la durée totale d'acquisition.

On conclut de cette analyse que *l'accumulation d'un nombre important de photons permet de compenser la résolution temporelle limitée des instruments*. L'IRF du photomultiplicateur ne constitue donc pas un frein limitant la résolution temporelle des mesures dès lors que le nombre de photons détectés est suffisant.

3.3.1 Généralisation : notion de profondeur limite

Nous définissons la profondeur limite comme étant la profondeur au-delà de laquelle la résolution temporelle du détecteur (ΔT_{IRF}) devient négligeable devant l'incertitude due à la propagation dans le milieu ($\Delta T_{propagation}$). On choisit arbitrairement la condition :

$$\Delta T_{propagation} \geq 10 \Delta T_{IRF} \quad (3.16)$$

Une expression de $\Delta T_{propagation}$ en fonction de la distance r_{sd} entre une source de lumière et un détecteur a été démontrée par Aurélie Laidevant [69] et Nicolas Ducros [70] :

$$\Delta T_{propagation} = \frac{r_{sd}^{\frac{1}{2}}}{2cD^{\frac{1}{4}}\mu_a^{\frac{3}{4}}} \quad (3.17)$$

avec $D = \frac{1}{3(\mu_a + \mu'_s)}$ et c la vitesse de la lumière dans le vide.

On peut également montrer que dans le cas d'une source s , d'une inclusion fluorescente m et d'un détecteur d , cette relation devient :

$$\Delta T_{propagation} = \sqrt{\Delta T_{sm}^2 + \tau^2 + \Delta T_{md}^2} = \sqrt{\frac{z}{2(c/n) D^{\frac{1}{2}} \mu_a^{\frac{3}{2}}} + \tau^2} \quad (3.18)$$

avec τ le déclin de fluorescence.

A l'aide de 3.18, la condition 3.16 s'écrit :

$$\frac{z}{2(c/n) D^{\frac{1}{2}} \mu_a^{\frac{3}{2}}} + \tau^2 \geq (10 \cdot \Delta T_{IRF})^2 \quad (3.19)$$

$$z \geq 2(c/n) D^{\frac{1}{2}} \mu_a^{\frac{3}{2}} (100 \cdot \Delta T_{IRF}^2 - \tau^2) \quad (3.20)$$

Le tableau suivant donne les valeurs de la profondeur z limite obtenue pour le système TCSPC décrit page 99, et la durée de vie de fluorescence moyenne de l'ICG τ de 0,5 ns :

	profondeur limite
sein	0,365 cm
peau	0,612 cm
muscle	1,020 cm
prostate	1,710 cm

Lorsque l'inclusion se situe à une profondeur supérieure à cette limite, on peut totalement négliger l'IRF de l'instrument qui n'a plus aucune influence sur l'incertitude de mesure.

Toutefois, l'IRF, ou résolution temporelle, du détecteur n'est pas le seul élément pouvant dégrader la mesure du temps de vol moyen. Nous allons tâcher d'étudier l'influence du courant d'obscurité et de la gigue (jitter) du détecteur sur l'incertitude de mesure.

3.4 Influence du courant et du bruit d'obscurité du détecteur sur la mesure du temps de vol

Le courant d'obscurité étant souvent considéré comme un facteur d'incertitude en instrumentation, nous allons évaluer son influence sur la mesure du temps de vol moyen.

Dans chaque canal temporel t_i , s'ajoutent aux N_i photons de fluorescence un nombre N_{dc} de photons d'obscurité. En effet, les photons issus du courant d'obscurité ont autant de chance d'être détectés à l'instant t_i qu'à l'instant t_{i+1} . Le temps de vol mesuré devient donc :

$$\langle t \rangle = \frac{\sum_{i=1}^K (N_i + N_{dc}) \times t_i}{\sum_{i=1}^K (N_i + N_{dc})} \quad (3.21)$$

$$\langle t \rangle = \frac{1}{N} \left(\sum_{i=1}^K N_i t_i + N_{dc} \sum_{i=1}^K t_i \right) \quad (3.22)$$

$$\langle t \rangle = \langle t \rangle_0 + \frac{N_{dc} \cdot h \cdot K}{N} \quad (3.23)$$

avec $\langle t \rangle_0$ le temps de vol moyen obtenu avec un détecteur parfait (sans courant d'obscurité), N le nombre de photons accumulés pendant la mesure (tel que $N = \sum_{i=1}^K (N_i + N_{dc})$), h le pas de quantification temporel de la carte TCSPC, et K le nombre de canaux.

On veillera donc à soustraire cet offset à chaque temps de vol mesuré sous peine d'introduire un biais de valeur $\frac{N_{dc} \cdot h \cdot K}{N}$ dans les mesures.

Le bruit d'obscurité qui est la composante aléatoire associée à ce courant peut être négligé dans la majorité des situations. En effet, d'une part son écart type varie suivant $\sqrt{N_{dc}}$ qui est généralement très faible, et d'autre part sa contribution à l'incertitude du temps de vol est réduite d'un facteur \sqrt{N} (voir l'équation 3.6 page 109).

3.5 Incertitude liée à la présence du « jitter » de la chaîne TCSPC

Nous cherchons à évaluer l'influence du « jitter » dans le système TCSPC. Celui-ci trouve principalement son origine dans le discriminateur à fraction constante de la carte TCSPC. En effet, le « jitter » du laser est extrêmement faible (inférieur à la femto-seconde) et peut toujours être négligé par rapport à celui du détecteur.

En raison du « jitter » de la carte TCSPC, certains photons, qui auraient dû être classés dans un canal temporel t_i , se retrouvent dans un autre t_{i+j} . La contribution d'un « jitter » de variance $\sigma_{t_i}^2$ à l'incertitude de mesure du temps de vol moyen s'écrit :

$$\sigma_{<t>}^2 = \sum_{i=1}^K \left(\frac{\partial <t>}{\partial t_i} \right)^2 \sigma_{t_i}^2 \quad (3.24)$$

Avec $\frac{\partial <t>}{\partial t_i} = \frac{N_i}{N}$, cette équation se simplifie en :

$$\sigma_{<t>}^2 = \frac{1}{N^2} \sum_{i=1}^K N_i \sigma_{t_i}^2 \quad (3.25)$$

Si l'on fait l'hypothèse que la variance du « jitter » est la même pour tous les canaux temporels, on obtient :

$$\sigma_{<t>}^2 = \frac{\sigma_{t_i}^2}{N} \quad (3.26)$$

On constate que la contribution du « jitter » à l'incertitude est réduite proportionnellement au nombre de photons accumulés.

Dans le cas de la carte SPC-134, l'écart type est estimé à 2,5 ps. A l'aide de la formule 3.26, on déduit que dès que l'on détecte plus d'une dizaine de photons par seconde, le « jitter » peut être négligé devant les autres sources d'incertitude ($\sigma_{<t>} = 2,5$ fs pour $N = 10^6$ photons).

3.6 Bilan des sources d'incertitude sur du temps de vol moyen mesuré par une chaîne TCSPC

Nous venons de montrer les trois points suivants :

- L'incertitude sur la mesure du temps de vol moyen dépend plus du nombre de photons détectés que de l'IRF du système de détection. Cette dernière peut être complètement négligée au-delà d'une profondeur limite dépendant principalement du coefficient d'absorption du tissu.
- Le courant d'obscurité a une influence directe sur la mesure du temps de vol moyen, alors que le « jitter » peut être négligé dès que le nombre de photons est suffisant.
- L'ordre de grandeur de l'incertitude sur la mesure des temps de vol que l'on peut s'attendre à obtenir dans le cas d'un signal typique de 10^6 photons, est de 0,22 ps.

Cette étude est basée sur une analyse de l'incertitude d'une mesure dans un intervalle de temps relativement court : elle permet, par exemple, d'estimer l'écart qu'il peut y avoir entre deux couples source-détecteur au cours d'une même acquisition. Toutefois, pour que cette étude soit complète, il est nécessaire d'évaluer la stabilité de ces mesures dans le temps, c'est à dire pour des expériences espacées de quelques minutes à plusieurs heures.

3.7 Stabilité des mesures d'intensité et de temps de vol par TCSPC

Nous cherchons à évaluer la stabilité des mesures d'intensité et de temps de vol au cours du temps, ainsi que l'impact de ces instabilités sur la précision de localisation de l'inclusion. Pour cela nous plaçons la fibre d'excitation directement face à une fibre de détection, en dehors du milieu diffusant pour pas perturber la mesure par le changement éventuel des propriétés optiques du milieu au cours du temps. Un diffuseur mince est placé entre les fibres d'excitation et de détection, afin de mesurer des impulsions laser les plus étroites et stables possible. Nous nous affranchissons ainsi, par exemple, des variations éventuelles de rendement du fluorophore (photoblanchiment). Nous mesurons l'intensité moyenne et le temps de vol moyen des photons en réglant les paramètres expérimentaux (gain des PMT, seuil de la carte de comptage) à leur point de fonctionnement optimal. Le résultat est présenté sur la figure suivante :

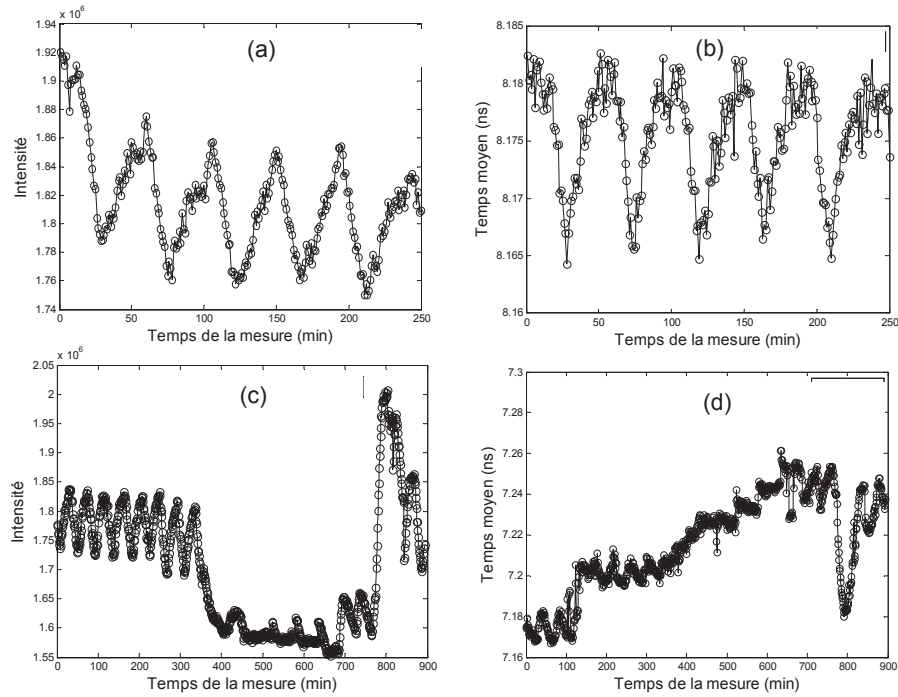


FIGURE 3.3 – (a) Reproductibilité des mesures d'intensité pendant une courte durée
(b) Reproductibilité des mesures de temps de vol moyen pendant une courte durée
(c) Reproductibilité des mesures d'intensité pendant une longue durée
(d) Reproductibilité des mesures de temps de vol moyen pendant une longue durée

Nous constatons une tendance d'évolution cyclique légère sur l'intensité et une plus marquée sur les temps moyens. Ces variations suivent une période de 40 minutes pendant le jour et un décrochement pendant la nuit. L'écart type sur la mesure des intensités est de 2 % et celui des temps de vol est de 0.3 % sur 2 heures. Cette erreur sur le temps de vol se traduit par une erreur de position maximale de $(t_{max} - t_{min}) \times v$ de 0,4 mm, soit 0,2 mm si l'on tient compte des trajets aller et retour (cas des propriétés optiques de la prostate).

Pour déterminer l'origine de cette instabilité, nous remplaçons le laser femto-seconde par une diode picoseconde. Les résultats obtenus sont quasiment similaires à ceux obtenus avec le laser femtoseconde (écart type 3% sur l'intensité et 0.2% sur les temps de vol pendant deux heures). Nous pouvons donc en déduire que *le problème ne vient pas du laser mais de la chaîne de détection*.

Nous avons pu établir une corrélation entre ces variations et la température ambiante, contrôlée par une climatisation asservie à une valeur de consigne. En mesurant la courbe de température de la pièce, nous avons constaté une variation cyclique de période 40 minutes avec un décrochement pendant la nuit (figure 3.4). Nous pouvons donc en déduire que *les instabilités sont liées à la température de la pièce*.

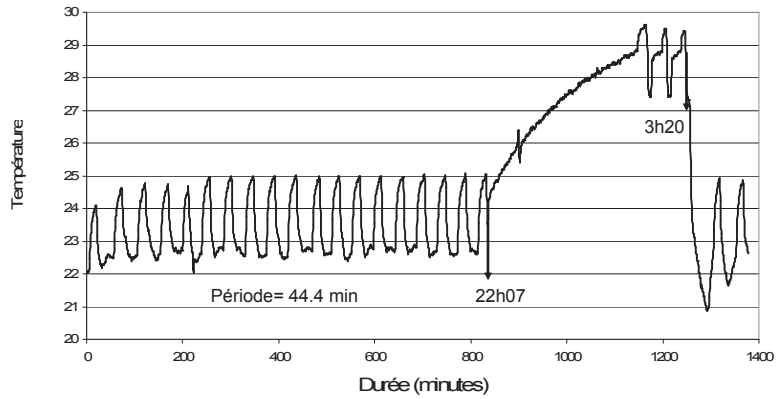


FIGURE 3.4 – Évolution de la température de la pièce pendant 24 heures.

En confinant le système de détection pour l’isoler au maximum du système de climatisation, nous avons pu réduire les instabilités d’un facteur 2 environ.

Pour déterminer le composant sensible à ces variations de température, nous procédons par déduction : en supprimant le balayage du laser devant les fibres d’excitation, nous n’avons pas constaté d’interruption des instabilités, ce qui permet d’éliminer l’éventualité d’un problème de couplage. Nous avons également remplacé la carte TCSPC par une autre carte d’un modèle plus ancien, avec des réglages (seuil) différents, sans constater de changement dans les instabilités. La seule origine possible des instabilités provient donc des photomultiplicateurs. Le fabricant, contacté par nos soins, n’a pas été en mesure de nous expliquer l’origine de ces fluctuations.

On notera que ces résultats concernant la stabilité d’une chaîne de mesure TCSPC sont assez proches d’une caractérisation menée par une autre équipe [83] dans le cas de mesures endogènes. Cette équipe avait montré une fluctuation de 4% en intensité et de $0,08^\circ$ en phase pour une chaîne TCSPC, ce qui correspond à un système un peu moins stable que le nôtre. Toutefois, cette équipe ne semble pas avoir envisagé la possibilité d’une influence de la température de la pièce.

Plusieurs laboratoires européens ont publié ensemble un protocole visant à comparer les performances des chaînes de mesure des propriétés endogènes (« MEDPHOT protocole »). Cette étude a notamment montré que la reproductibilité du coefficient d’absorption d’un fantôme estimé par une même chaîne résolue en temps est de $\pm 3\%$. Pour le coefficient de diffusion, le coefficient de variation est plus élevé : 4,7%. Ces variations sont donc du même ordre de grandeur que la reproductibilité de mesure de l’intensité et du temps de vol moyen. Toutefois, les auteurs du « MEDPHOT protocole » attribuent ces fluctuations au « jitter » des impulsions laser, ce qui n’est pas en accord avec nos observations.

3.8 Analyse de l'incertitude sur les temps de vols dans le cas d'un système de fenêtrage temporel (HRI)

3.8.1 Mesure de l'IRF de la caméra rapide intensifiée

Nous avons vu que la largeur de l'IRF du HRI était une donnée importante pour estimer la sensibilité du détecteur, puisqu'elle détermine la proportion de photons comptabilisés par le fenêtrage temporel. Nous allons présenter ci-dessous les résultats de mesure de l'IRF du HRI, et expliciter ses conséquences sur l'incertitude de mesure du temps de vol moyen.

Pour mesurer l'IRF du HRI, nous injectons dans une fibre optique la lumière du laser femto-seconde réglé à 775 nm. La sortie de la fibre est placée face au HRI. On fait alors varier le retard de la porte sur un intervalle de 1 ns. Cette opération est reproduite pour plusieurs valeurs de la distance entre la fibre d'excitation et le détecteur, afin de contrôler la stabilité de la porte et la linéarité du retard. La tension du MCP est adaptée au niveau de signal lumineux afin d'exploiter au mieux la dynamique de la caméra. Les IRF obtenues sont présentées sur la figure ci-après :

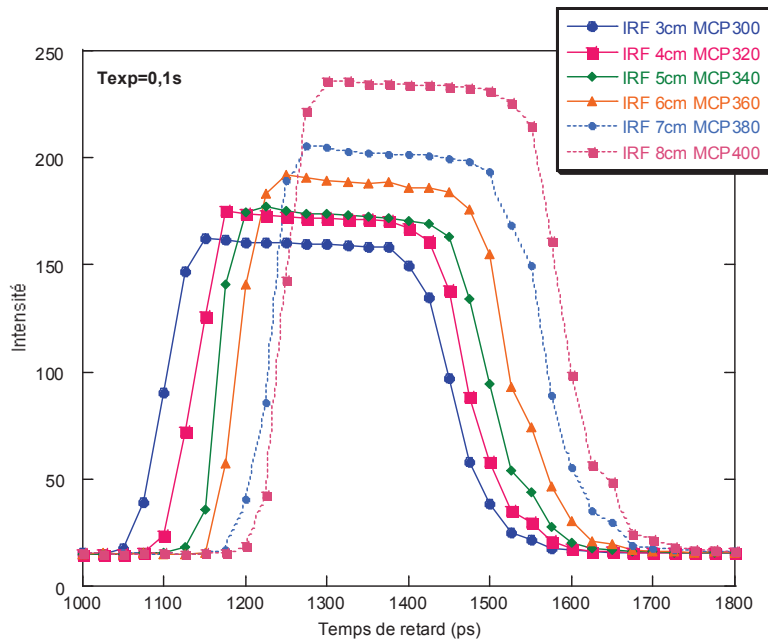


FIGURE 3.5 – Réponse du HRI à une impulsion temporelle femto-seconde (IRF). Les différentes courbes correspondent à des distances source-détecteur différentes. Le gain du MCP est adapté à chaque situation pour compenser les variations d'intensité du signal.

Les profils d'IRF obtenus correspondent assez bien à une fonction porte, ce qui valide l'hypothèse que nous avons faite pour établir l'équation 2.9 page 102. La largeur à mi-hauteur de cette porte, 350 ps, est légèrement supérieure à la valeur de consigne (300 ps).

On constate également une légère dissymétrie du profil temporel : les premiers photons semblent légèrement plus amplifiés que les suivants. Cette dissymétrie peut s'expliquer par un effet capacitif dans l'électronique de pilotage de la tension de la photocathode. Par rapport à une porte mathématique parfaite, cette dissymétrie pourrait induire un biais systématique sur l'estimation du temps de vol moyen, en décalant celle-ci vers les temps courts. Toutefois, en prenant en compte la soustraction du temps de vol de fluorescence avec celui de diffusion, notre méthode de localisation permet de nous affranchir de ce biais.

On notera également que le décalage de l'IRF en fonction de la distance entre les fibres correspond parfaitement au temps dû au parcours de la lumière dans l'air (30 ps/cm). Ce constat renforce l'idée déjà évoquée selon laquelle la résolution temporelle du détecteur (ici 350 ps) ne constitue pas une limite pour la mesure des temps de vol, puisqu'on a pu observer des phénomènes d'une durée bien inférieure (un incrément de 30 ps de pas).

3.8.1.1 Conséquence sur l'incertitude des temps de vols

Le calcul ayant permis de déterminer l'incertitude sur les temps de vols mesurés par une chaîne TCSPC reste valable pour un HRI à condition de tenir compte de la perte de photons due au fenêtrage temporel. On obtient ainsi :

$$\sigma_{<t>}^2 = \frac{\Delta T_{mesuré}^2}{N_{comptés}} = \frac{\Delta T_{mesuré}^2 \cdot (t_{max} - t_{min})}{N \cdot L} \quad (3.27)$$

avec t_{min} et t_{max} désignant les bornes de la distribution temporelle étudiée, L la largeur de la porte, et N le nombre de photons incidents pendant la durée d'acquisition.

Or, on a vu page 110 que les propriétés de la convolution conduisent à :

$$\Delta T_{mesuré}^2 = \Delta T_{propagation}^2 + \Delta T_{IRF}^2 \quad (3.28)$$

Dans le cas d'une porte de largeur L , ΔT_{IRF}^2 vaut $L^2/4$. On doit également tenir compte de l'élargissement de l'étalement total de la distribution temporelle. Ainsi, $(t_{max} - t_{min})$ devient $\sqrt{(t_{max} - t_{min})^2 + L^2/4}$. Et l'on obtient :

$$\sigma_{<t>}^2 = \frac{(\Delta T_{propagation}^2 + L^2/4) \cdot \left(\sqrt{(t_{max} - t_{min})^2 + L^2/4} \right)}{N \cdot L} \quad (3.29)$$

La figure 3.6 montre l'allure de la variance du temps de vol moyen en fonction de L pour différentes valeurs du coefficient d'absorption.

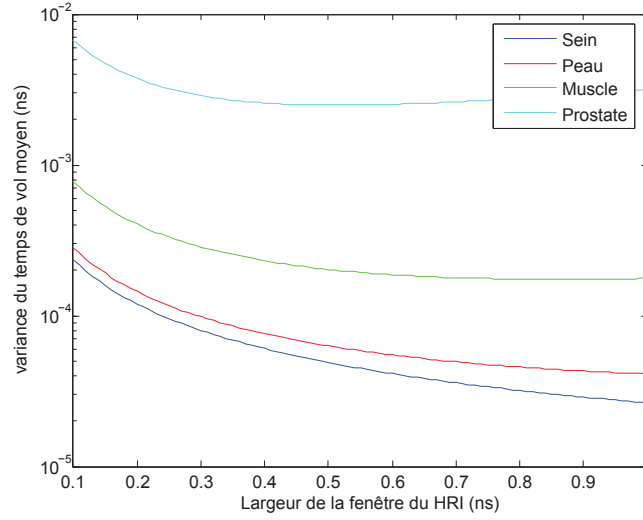


FIGURE 3.6 – Variance du temps de vol en fonction de la largeur de la porte temporelle. Courbe obtenue pour une inclusion située à 1 cm de profondeur, pour 4 milieux diffusants d'absorption variable (simulation).

On remarque pour les faibles valeurs de L une incertitude importante, due à la faible proportion de photons collectés qui a pour conséquence une élévation du bruit photonique (contribution du dénominateur de l'équation 3.29). Pour les milieux les plus absorbants (prostate), on constate que l'incertitude diminue jusqu'à atteindre un optimum (500 ps), puis croît de nouveau. L'augmentation de l'incertitude avec L s'explique par l'élargissement de la distribution temporelle due à la contribution du terme $L^2/4$ qui devient prépondérant sur $\Delta T_{propagation}^2$, plus faible si μ_a est grand. Dans les autres tissus, l'incertitude décroît avec L , ce qui montre que l'augmentation du nombre de photons collectés demeure prépondérante par rapport à l'élargissement de la distribution temporelle. Néanmoins, si l'on traçait la courbe pour des valeurs plus élevées de L , on finirait également par observer une augmentation de l'incertitude.

3.8.2 Bilan de l'incertitude sur la mesure du temps de vol moyen par un HRI

Dans le cas d'un HRI, la largeur de l'IRF de la fenêtre temporelle va déterminer la proportion de photons perdus à chaque acquisition, et donc l'incertitude de mesure de $\langle t \rangle$. On perdra d'autant plus de photons que l'IRF est fine, et donc que le détecteur est temporellement résolu, ce qui peut apparaître paradoxal. Cependant, dans le cas de milieux fortement absorbants, la fenêtre temporelle ne doit pas être choisie excessivement large sous peine d'impacter négativement la résolution temporelle.

Ce comportement est donc très différent du cas du TCSPC pour lequel on a montré que la résolution temporelle (largeur de l'IRF) jouait finalement peu sur l'incertitude

de mesure du temps de vol moyen.

3.8.3 Stabilité des mesures d'intensité et de temps de vol par HRI

Un essai de stabilité comparable à celui réalisé pour la chaîne TCSPC n'a pas permis de mettre en évidence des fluctuations similaires. Toutefois, la durée d'acquisition nécessaire à l'obtention d'une distribution temporelle (typiquement 50 minutes) a peut-être eu un effet de lissage sur les fluctuations due au cycle de température de 40 minutes.

3.8.4 Bilan comparatif de l'incertitude sur la mesure des temps de vol par HRI et TCSPC

Le tableau suivant exprime les contributions à la variance¹ du temps de vol moyen $\sigma_{<t>}^2$ mesuré par la chaîne TCSPC et le HRI étudiés.

Variance (ps^2)	TCSPC	HRI
« jitter » laser	$\frac{0,1^2}{\eta\Phi}$	$\frac{0,1^2}{\alpha\eta\Phi}$
Rés. temp. détecteur	$\frac{150^2}{\eta\Phi}$	$\frac{60^2}{\alpha\eta\Phi}$
Rés. temp.analyseur	$\frac{1}{\eta\Phi}$	$\frac{300^2}{\alpha\eta\Phi}^*$
Propagation dans le milieu	$\frac{\Delta T_{propagation}^2}{\eta\Phi}$	$\frac{\Delta T_{propagation}^2}{\alpha\eta\Phi}$
Instabilité thermique	0,2 %	non mesurable

* pour le mode « GOI » conservant une impulsion sur 100, on aurait une variance de $\frac{100^2}{\alpha\eta\Phi/100}$.

TABLE 3.1 – Formules permettant d'obtenir les différentes contributions à la variance sur le temps de vol moyen mesuré par une chaîne TCSPC et un HRI ;

avec η le rendement quantique de la photocathode, $\alpha = \frac{L}{(t_{max}-t_{min})}$ la proportion de photons comptabilisés par le fenêtrage temporel du HRI et $\Phi = \phi \cdot t_{expo total}$ le nombre de photons incidents sur le détecteur pendant la durée d'acquisition.

Pour comparer ces sources d'incertitude de façon quantitative, nous avons reporté sur la figure 3.7 (a) leur contribution à la variance du temps de vol moyen, pour le cas typique décrit page 111 (inclusion à 1 cm de profondeur dans un milieu simulant le sein, et générant sur le détecteur un flux de photons de $\phi = 8.10^6 \text{ photons.s}^{-1}$). Le temps d'intégration, identique pour les deux systèmes, est arbitrairement fixé à une minute.

1. Pour plus de lisibilité, les coefficients ci-dessus ne tiennent pas compte du facteur correctif (2,35) permettant de passer de la largeur à mi-hauteur à l'écart à la moyenne. Nous en tiendrons cependant compte dans l'analyse qui suit.

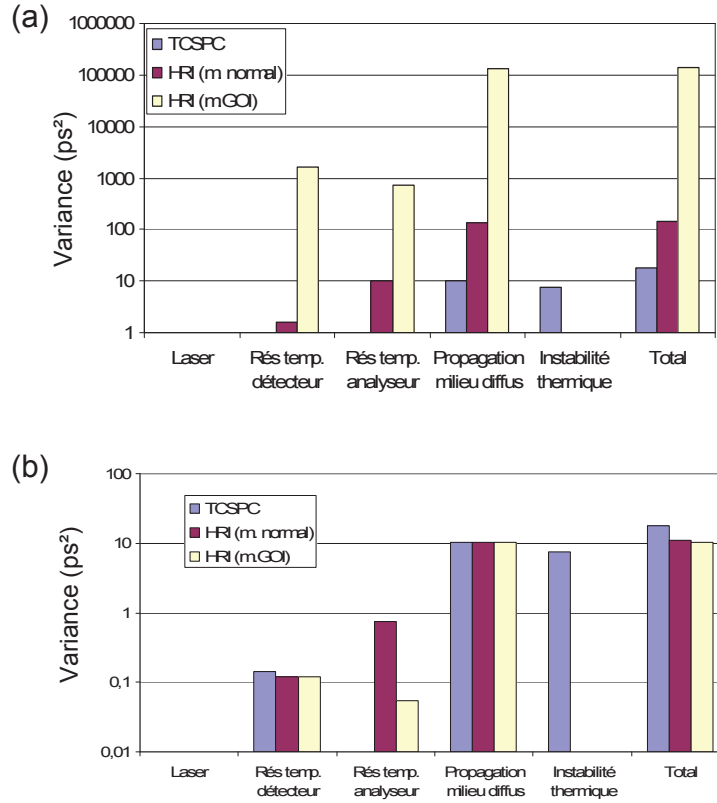


FIGURE 3.7 – Impact des différentes sources d'incertitude sur la variance du temps de vol moyen d'une chaîne TCSPC et d'un HRI en mode normal et « GOI ».

(a) Cas d'une durée d'acquisition totale fixe d'une minute.

(b) Cas d'un nombre de photons comptabilisés fixe de $N = 10^6$, sans contrainte sur le temps d'intégration.

On constate que la source d'incertitude majoritaire provient de la propagation de la lumière dans le milieu qui élargit la distribution temporelle. Or *cette incertitude est plus élevée dans le cas d'une mesure par HRI en raison du nombre plus faible de photons collectés permettant de la « moyenner »*. L'incertitude est encore plus grande avec le mode « GOI » puisque, pour raccourcir la fenêtre, on a réduit la cadence d'acquisition de 100 MHz à 1 MHz, ce qui entraîne la diminution du signal mesuré d'un facteur 100.

Etudions maintenant le cas d'une application pour laquelle le temps d'exposition n'est plus contraint. Nous ne fixons plus le nombre de photons incidents mais le nombre de photons effectivement mesurés. La comparaison des incertitudes pour un nombre de photons mesurés fixé arbitrairement à 10^6 est présentée sur la figure 3.7 (b). Nous constatons sur celle-ci que l'incertitude la plus importante demeure la dispersion des photons dans le milieu. Toutefois, dans ce cas précis, *l'incertitude obtenue avec le HRI est plus faible qu'avec le TCSPC*. Cela s'explique par les instabilités thermiques constatées sur la chaîne TCSPC qui deviennent prépondérantes et dégradent légèrement la mesure. On peut voir également sur ce graphique que l'utilisation d'un système GOI

dans le cas où l'on n'est pas limité par le nombre de photons permet une légère amélioration de la qualité de la mesure.

Ces constatations nous permettent d'identifier le type de détecteur optimal pour la mesure du temps de vol moyen selon l'application visée.

3.9 Type de détecteur optimal selon l'application visée

3.9.1 Un HRI pour une mesure sur de faibles épaisseurs (< 1 cm) ou dans des tissus faiblement absorbants

Dans le cas d'une mesure sur un tissu faiblement épais, *nous préférons utiliser une caméra intensifiée (HRI) équipée d'un système de fenêtrage temporel*. Nous appuyons cette affirmation sur deux arguments.

Premièrement, la fréquence spatiale du signal de fluorescence provenant de tissus faiblement épais est plus élevée.

Lorsqu'une inclusion ponctuelle est située à quelques millimètres sous la surface, le signal de fluorescence qu'elle génère a une faible étendue spatiale. En effet, comme la propagation dans les tissus s'est faite sur une courte distance, la fonction de Green correspondante présente un étalement limité dans le temps. Cet étalement limité dans le temps se traduit par une étendue spatiale également réduite en vertu de la relation 1.10 page 89. Si l'on décomposait l'image obtenue en série de Fourier, on observerait une densité d'énergie importante dans les fréquences spatiales élevées. Par conséquent, pour échantillonner spatialement ce signal de manière efficace, il convient d'utiliser un pas d'échantillonnage spatial élevé.

La capacité du HRI à mesurer simultanément des signaux provenant d'un nombre élevé de détecteurs répartis à la surface répond parfaitement à ce besoin. Ceci valide le choix des quatre équipes [34, 74, 75, 76] qui ont choisi un HRI pour réaliser des mesures de fluorescence sur petit animal (voir leur description page 94).

On pourrait toutefois opposer à cet argument l'idée qu'on obtiendrait un résultat équivalent avec un système TCSPC que l'on déplacerait successivement en plusieurs points de la surface, comme le fait le système proposé par ART. Cette solution nous paraît cependant moins satisfaisante, car les profils temporels provenant des différents points de détection ne sont pas mesurés simultanément. Les résultats obtenus peuvent alors être perturbés par le photoblanchiment du fluorophore, les fluctuations thermiques (voir page 116) et les mouvements éventuels du sujet, ce qui peut se traduire par une localisation incertaine des inclusions.

En résumé dans le cas de tissus de faible épaisseur, *on préférera utiliser un HRI pour sa capacité à échantillonner spatialement le tissu avec plus de finesse, tout en offrant des mesures simultanées en tous points*.

Deuxièmement, l'intensité du signal de fluorescence provenant de tissus faiblement épais est plus élevée.

La limite principale du HRI que l'on a montré et analysé au cours de ce chapitre vient de la perte de photons conséquente au système de fenêtrage temporel. On a vu que cette perte de photons avait notamment pour conséquence d'accroître l'incertitude de mesure de l'intensité et du temps de vol moyen.

Or, dans le cas d'un tissu de faible épaisseur, ceci ne constitue plus un problème puisque l'intensité du signal est ordinairement plus élevée que dans les tissus profonds. On se situe alors dans le cas de la figure 3.7 (b) page 123. Cette intensité plus élevée permet également de réduire la largeur de la fenêtre temporelle, afin d'améliorer la résolution temporelle de la chaîne de détection et de lui éviter de dégrader la mesure, puisque nous avons montré qu'à faible profondeur la résolution temporelle pouvait avoir une influence significative.

En outre, dès que le flux de photons dépasse le seuil de comptage maximum de la carte TCSPC (typiquement à $10^6 \text{ coups.s}^{-1}$), la distribution temporelle se trouve déformée vers les temps courts, et la mesure de l'intensité et du temps de vol devient erronée. Bien que des méthodes numériques aient été développées pour contourner partiellement ce problème, leur mise en œuvre n'a pas encore été démontrée sur des cas expérimentaux.

Au contraire, dans un HRI, la seule limitation du taux de comptage provient du seuil d'endommagement du MCP, qui est supérieur d'un ordre de grandeur au seuil de comptage de la carte TCSPC.

3.9.2 Une chaîne TCSPC pour localiser des inclusions plus profondes dans des tissus d'absorption élevée

Dans le cas de tissus épais ou fortement absorbants, on préférera utiliser une chaîne de détection TCSPC pour les deux raisons suivantes.

Premièrement, la sensibilité élevée de la chaîne TCSPC est plus adaptée à des signaux de faible intensité.

Nous avons montré que l'incertitude de mesure sur l'intensité et sur le temps de vol moyen augmente en $1/I$ (voir l'équation 3.6 page 109). Or dans la plupart des applications cliniques, il n'est pas possible d'accroître indéfiniment le temps d'exposition pour obtenir un nombre suffisant de photons. On se trouve donc dans le cas de la figure 3.7 (a) page 123, dans lequel le HRI est handicapé par son système de fenêtrage temporel : pour acquérir chaque point de la distribution temporelle, la fenêtre induit une perte d'un nombre important de photons (typiquement 92,5% du flux incident dans le cas décrit page 100).

Au contraire, dans le cas d'une chaîne TCSPC, la quasi-totalité des photons détectés par le photomultiplicateur est prise en compte. *La durée d'un examen réalisé avec une chaîne TCSPC pourra donc être plus courte*, par exemple pour améliorer le confort du patient. Toutefois il pourra durer aussi longtemps qu'avec un HRI, *en offrant une meilleure précision de localisation*. Enfin, l'examen pourra être réalisé avec une durée et une précision identiques mais *avec une source laser moins intense* ce qui facilite son intégration dans un protocole médical (risque laser diminué). Par exemple, un dispositif médical basé sur un HRI et un laser de 30 mW (classe 3) pourra être réalisé avec un

système TCSPC et un laser de 1 mW (classe 2) présentant peu de risque oculaire pour le patient et le praticien.

Deuxièmement, la finesse de l'échantillonnage spatial a moins d'importance dans le cas d'inclusions profondes.

La capacité du HRI à mesurer simultanément des signaux temporels provenant de plusieurs points de la surface s'avère être un atout dans le cas de tissus de faible épaisseur. Or cet avantage est moins important dans le cas d'un tissu très épais qui se comporte comme un filtre passe-bas pour les fréquences spatiales.

De plus, nous verrons dans le chapitre 5 page 136 que certaines géométries de mesure imposent d'utiliser un nombre réduit de voies d'excitation et de détection. C'est le cas, par exemple des examens endocavitaires, type prostate, ou de l'endoscopie vaginale. Ces applications nécessitent de miniaturiser la dimension de la surface où sont placés sources et détecteurs, ainsi que le canal de transmission de l'information lumineuse. Le nombre de fibres optiques permettant de relayer l'excitation laser et les signaux détectés est donc très limité, ce qui convient mieux aux chaînes TCSPC.

Après avoir identifié le détecteur optimal suivant l'application souhaitée, nous allons déterminer comment l'utiliser de façon à minimiser l'incertitude de mesure sur le temps de vol moyen.

Chapitre 4

Comment utiliser de façon optimale une chaîne TCSPC et un HRI pour mesurer les temps de vol moyens

L'analyse des sources d'incertitude sur la mesure du temps de vol moyen que nous avons menée dans le chapitre précédent va nous permettre de définir les paramètres d'utilisation optimaux d'une chaîne TCSPC et d'un HRI. Dans le cas d'une chaîne TCSPC, nous allons déterminer la largeur optimale des canaux temporels, et dans celui du HRI, la largeur de la fenêtre temporelle utilisée.

Réaliser une telle optimisation permettra de dimensionner, dans le cas du TCSPC une carte électronique plus simple et compacte que celles qui sont actuellement utilisées, la rendant ainsi plus compatible avec les contraintes d'encombrement et de coût des dispositifs médicaux. Dans le cas d'un HRI, qui sera donc utilisé préférentiellement pour des tissus de faible épaisseur ou faiblement absorbants, déterminer la largeur de fenêtre optimale permettra de réduire la durée d'acquisition tout en conservant une bonne précision de mesure du temps de vol moyen.

4.1 Dimension optimale des canaux temporels de la chaîne TCSPC

Une carte TCSPC est généralement dotée de $2^{12} = 4096$ canaux temporels. La largeur de ces canaux est réglée par défaut à 1 ps, ce qui permet d'analyser une distribution temporelle sur une durée maximale de 4 ns. Il est toutefois possible d'élargir la taille de ces canaux, ou de la rétrécir jusqu'à 0,1 ps. Depuis peu, certains constructeurs proposent des systèmes TCSPC à coût réduit mais dont la largeur des canaux minimale est de 30 ps. Dans la section suivante, nous allons déterminer la largeur optimale selon l'application visée.

4.1.1 Approche par la théorie des histogrammes

L'optimisation du nombre de classes d'un histogramme est un problème bien connu en statistique. Toutefois, les formules usuelles reposent sur des hypothèses fortes quant au type de distribution. Par exemple, la première règle proposée par Sturges [84] en 1926, reposait sur l'hypothèse d'une distribution binomiale de paramètre $p = 1/2$ [85]. Elle pose le nombre optimal de classes K comme :

$$K = \lceil 1 + \log_2(N) \rceil \quad (4.1)$$

où l'opérateur $\lceil \cdot \rceil$ désigne la fonction partie entière par excès.

En 1979, Scott [86] a proposé une autre formule correspondant à la minimisation de l'écart entre la distribution réelle et l'histogramme. Cette formule, actuellement la plus utilisée, notamment par les tableurs modernes (Excel), est la suivante :

$$K = \sqrt{N} \quad (4.2)$$

Elle assure un nombre moyen d'éléments par classe identique au nombre de classes. Si l'amplitude de l'histogramme vaut $W = t_{max} - t_{min}$, alors l'amplitude de chaque classe s'écrit $h = \frac{W}{K}$, grandeur qu'il convient d'arrondir à l'excès à un multiple de la résolution de l'instrument de mesure. Dans le cas de la chaîne TCSPC, pour un nombre de photons typique $N = 14.10^6$ et une amplitude d'histogramme de 4 ns, la largeur optimale du canal temporel vaut donc 1,05 ps. Cette valeur correspond à la largeur par défaut du canal temporel, ce qui explique et justifie le choix du réglage par défaut du constructeur.

Toutefois, la formule 4.2 correspond à une *optimisation de l'allure* de la courbe, de manière à observer des tendances ou à reconnaître tel ou tel type de distribution, gaussienne ou poissonnienne par exemple.

Or, dans le cas de la localisation d'une inclusion fluorescente, ce n'est pas l'allure de la distribution mais l'intensité et le temps de vol moyen que nous cherchons à déterminer. Pour optimiser la largeur des canaux temporels, nous devons modéliser son influence sur la précision des temps de vol moyens. Pour cela, nous faisons appel à la théorie du traitement du signal concernant la quantification d'un signal analogique.

4.1.2 Approche par la théorie de la quantification

L'opération consistant à classer chaque photon dans l'un des différents canaux temporels *correspond à réaliser une quantification du temps de vol de chaque photon détecté*. En effet, le temps de vol t_j du $j^{\text{ème}}$ photon peut prendre n'importe quelle valeur de \mathbb{R}^+ et se transforme en \hat{t}_j un multiple fini et borné de la largeur d'un canal temporel. Cette transformation de type $t_j : \mathbb{R}^+ \mapsto \hat{t}_j = i \times h$ avec $i \in \{0, 1, 2, \dots, K\}$ correspond bien à une quantification.

La formule usuelle du traitement du signal donnant l'erreur de quantification n'est cependant pas utilisable directement. En effet, celle-ci est donnée pour un signal analogique variant avec le temps et dont on cherche à quantifier l'*amplitude*, après l'avoir échantillonné temporellement. Dans notre cas, ce n'est pas l'amplitude des pulses qui nous intéresse mais le temps de vol moyen.

Nous allons modéliser l'erreur due à la quantification d'un échantillon (un photon) par un bruit de mesure dont nous déterminerons la variance. La figure 4.1 montre un exemple de simulation d'une distribution temporelle avant et après quantification, ainsi que l'erreur de quantification associée.

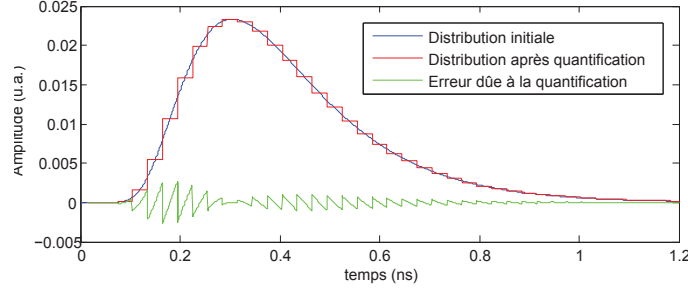


FIGURE 4.1 – Exemple de quantification d'une distribution temporelle du signal de fluorescence provenant d'une inclusion située à 2 cm de profondeur dans un milieu d'absorption intermédiaire ($\mu_a = 0,2 \text{ cm}^{-1}$).

La courbe bleue représente la distribution temporelle initiale.

La courbe rouge représente cette même distribution après quantification par une chaîne TCSPC dont la largeur de canal est réglée à 30 ps.

La courbe verte représente l'erreur de quantification, dont la moyenne peut être considérée comme nulle et la densité de probabilité uniforme sur un intervalle $[0, +h]$.

On cherche à évaluer la variance de l'erreur de quantification du canal temporel i , notée $\sigma_{t_j}^2$:

$$\sigma_{t_j}^2 = E(|t_j - \hat{t}_j|^2) = \int_{h_i}^{h(i+1)} p(t_j) (t_j - \hat{t}_j)^2 dt_j \quad (4.3)$$

avec $p(t)$ représentant la densité de probabilité de l'erreur sur un intervalle $[0, h]$. On fait l'hypothèse que cette densité de probabilité est uniforme sur cet intervalle : $p(t_j) = \frac{1}{h} \forall t_j \in [0, h]$.

S'il s'agit d'une quantification de type « uniforme », c'est à dire par arrondi plutôt que par troncature, alors pour le canal i , on a : $\hat{t}_j = ih + h/2$, soit :

$$\sigma_{t_j}^2 = \int_{h_i}^{h(i+1)} \frac{1}{h} (t_j - ih - h/2)^2 dt_j \quad (4.4)$$

A l'aide du changement de variable $t'_j = t_j - ih$, l'expression précédente se simplifie en :

$$\sigma_{t_j}^2 = \int_0^h \frac{1}{h} (t'_j - h/2)^2 dt'_j \quad (4.5)$$

$$\sigma_{t_j}^2 = \frac{1}{h} \cdot \frac{1}{3} (t'_j - h/2)^3 \Big|_0^h \quad (4.6)$$

$$\sigma_{t_j}^2 = \frac{1}{3h} \left(\left(\frac{h}{2} \right)^3 - \left(-\frac{h}{2} \right)^3 \right) \quad (4.7)$$

$$\sigma_{t_j}^2 = \frac{h^2}{12} \quad (4.8)$$

Nous retrouvons la formule classique du traitement du signal donnant la variance du bruit de quantification. Toutefois, nous notons que pour y parvenir nous avons dû faire l'hypothèse que la densité de probabilité de *l'erreur de quantification est uniforme sur chaque quantum temporel*. Cette hypothèse est acceptable tant que la largeur des canaux est suffisamment petite par rapport à la largeur de la distribution du signal.

Il s'agit maintenant de déterminer l'impact de ce bruit, donné pour un seul photon, sur le temps moyen d'une distribution de N photons. Contrairement au cas de l'incertitude sur les temps de vol dû au bruit photonique où l'on pouvait grouper N_i photons dans chaque canal temporel t_i , on doit ici considérer chaque photon individuellement. Le temps de vol moyen $\langle t \rangle$ d'un ensemble N de photons détectés s'écrit :

$$\langle t \rangle = \frac{1}{N} \sum_{j=1}^N t_j \quad (4.9)$$

avec t_j représentant le temps de vol réel du $j^{\text{ème}}$ photon (à ne pas confondre avec t_i qui désignait le $i^{\text{ème}}$ canal temporel).

La loi de propagation des incertitudes 3.2 page 109 appliquée à 4.9 donne :

$$\sigma_{\langle t \rangle}^2 = \sum_{j=1}^N \left(\frac{\partial \langle t \rangle}{\partial t_j} \right)^2 \sigma_{t_j}^2 \quad (4.10)$$

Avec $\frac{\partial \langle t \rangle}{\partial t_j} = \frac{1}{N}$, on obtient :

$$\sigma_{\langle t \rangle}^2 = \sum_{j=1}^N \frac{\sigma_{t_j}^2}{N^2} \quad (4.11)$$

En combinant 4.8 et 4.11, on obtient :

$$\sigma_{\langle t \rangle}^2 = \frac{h^2}{12N} \quad (4.12)$$

L'écart type du temps de vol moyen varie donc en $\frac{1}{\sqrt{N}}$, de la même manière que l'écart type dû au bruit photonique. On en tire les conclusions suivantes :

1. L'erreur due à la quantification des photons dans les différents canaux temporels est donc minimisée par l'accumulation d'un nombre important de photons, tout comme l'erreur due au bruit photonique. On notera que cette conclusion va à l'encontre de l'analyse initiale reposant sur la théorie des histogrammes (voir l'équation 4.2 page 128) qui stipulait qu'il faut rendre les canaux plus fins lorsque N augmente. Cette théorie est certes valable pour optimiser l'allure d'un histogramme mais pas pour optimiser l'estimation d'une valeur moyenne.

2. Ce résultat nous permet d'évaluer une condition sur la valeur de h pour que l'on puisse négliger l'influence du bruit de quantification temporel par rapport au bruit photonique. Cette condition, indépendante de N s'écrit :

$$\frac{h^2}{12} \ll \Delta T^2 \quad (4.13)$$

avec ΔT désignant la largeur de la distribution des temps de vol.

Par exemple, si l'on considère que le bruit de quantification doit être inférieur de deux ordres de grandeur au bruit photonique pour pouvoir être négligé, on peut déduire une borne supérieure de la largeur de canal optimale :

$$h \leq \frac{2\sqrt{3}}{100} \Delta T_{mesuré} \quad (4.14)$$

Dans le cas de la distribution temporelle expérimentale de la figure 3.2 page 112, nous obtenons une largeur de canal optimale $h_{optimal} = 30$ ps.

Cette dimension de canal optimal est 30 fois plus large que la valeur par défaut de la carte de comptage. L'échantillonnage actuel est donc excessif par rapport au besoin dans cet exemple, et l'on peut envisager de le réduire tout en conservant une mesure du temps de vol aussi précise.

4.1.3 Pas de quantification temporel optimal : généralisation

Pour déterminer la largeur optimale du canal temporel dans un cas général, nous combinons l'expression algébrique de l'écart au temps moyen 3.18 page 113 avec l'équation 4.13 pour obtenir :

$$h \ll \sqrt{\frac{6z}{(c/n) D^{\frac{1}{2}} \mu_a^{\frac{3}{2}}} + 12\tau^2} \quad (4.15)$$

On peut déduire de cette expression les points suivants :

1. Ce résultat confirme et précise la conclusion précédente : le pas de quantification peut être d'autant plus large que l'inclusion à localiser est profonde. Plus précisément, le pas optimal h varie en racine carrée de la distance à parcourir.
2. Les paramètres optiques du milieu vont influencer sur le pas de quantification optimal. Étant donné que la grandeur $D^{\frac{1}{4}} \mu_a^{\frac{3}{4}}$ varie comme $\frac{\mu_a^{\frac{3}{4}}}{\mu_s^{\frac{1}{4}}}$, (hypothèse $\mu_a \ll \mu_s'$) on en déduit que le pas de quantification temporelle optimal doit être plus fin lorsqu'on doit investiguer des tissus plus absorbants. On peut interpréter ce résultat de la manière suivante : dans les tissus plus absorbants, la vitesse moyenne de déplacement des photons v est plus rapide. L'étalement de la distribution temporelle mesurée par le détecteur est donc moindre. Par conséquent, il faut un pas temporel plus fin pour l'appréhender correctement.

La figure 4.2 montre l'évolution du pas de quantification optimal en fonction de la profondeur de l'inclusion recherchée.

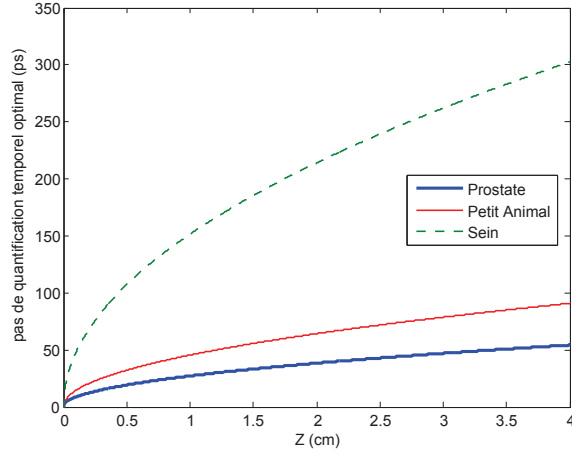


FIGURE 4.2 – Évolution de la largeur optimale des canaux temporels pour une chaîne TCSPC en fonction de la profondeur attendue de l'inclusion pour différentes catégories de tissus (sein, prostate et petit animal).

Pour l'obtenir, nous avons utilisé l'inéquation 4.13, en considérant que pour être négligeable, l'impact du pas de quantification sur la mesure du temps de vol moyen doit être inférieure à 1% de l'incertitude due à la propagation dans les tissus. Cette figure illustre les points 1. et 2. évoqués précédemment. Elle montre également que dans le cas du sein, on peut très bien réaliser des mesures de temps de vol avec des systèmes dont le pas de quantification est bien plus large (200 ps pour une inclusion située à 2 cm sous la surface) que celui utilisé typiquement dans les systèmes présentés dans la littérature (typiquement 0,1 à 1 ps).

Cette étude ouvre donc la voie à la réalisation de *systèmes compacts et peu coûteux*, tout en conservant une approche par mesure des temps de vol moyen. Elle offre ainsi une alternative aux approches fréquentielles.

Une manière de réaliser un tel système optimisé consisterait à remplacer la chaîne TCSPC (Becker&Hickl) par une chaîne de comptage plus compacte (SENSL) dont le pas de quantification est limité à 23 ps. Un tel appareil, d'un prix de revient cinq fois inférieur à celui d'une chaîne TCSPC traditionnelle fournirait des mesures de temps de vol de qualité équivalente (à 1% près) à celle d'une chaîne haute performance.

4.2 Optimisation du paramétrage d'un système de fenêtrage temporel

Comparé à un système TCSPC, l'optimisation d'un système de fenêtrage temporel (HRI) est plus complexe. En effet, il faut tenir compte non seulement de l'erreur de quantification induite par le changement de la largeur temporelle, mais aussi de l'impact sur le nombre de photons collectés. En fonction de la largeur de la porte temporelle, une proportion plus ou moins importante de photons détectables est perdue comme on l'avait montré sur la figure 2.3 page 104, ce qui n'était pas le cas de la chaîne TCSPC.

Deux paramètres interviennent : la largeur de la fenêtre et le pas de balayage (retard) utilisés pour constituer la distribution temporelle des photons. Dans une première étape, nous déterminerons le pas de balayage temporel (retard) Γ optimal pour la mesure du temps de vol moyen, puis nous évaluerons la largeur optimale de la porte.

4.2.1 Pas de balayage optimal

Nous avons vu page 120 que l'incertitude sur les temps de vols mesurés par un HRI s'écrit :

$$\sigma_{<t>}^2 = \frac{(\Delta T_{propagation}^2 + L^2/4) \cdot \left(\sqrt{(t_{max} - t_{min})^2 + L^2/4} \right)}{N.L} \quad (4.16)$$

avec $\Delta T_{propagation}^2$ désignant la dispersion des photons dans le milieu, t_{min} et t_{max} les bornes de la distribution temporelle, L la largeur de la porte, et N le nombre de photons incidents pendant la durée d'acquisition. Nous avons vu que dans la plupart des cas $L \leq t_{max} - t_{min}$, ce qui permet de simplifier en :

$$\sigma_{<t>}^2 \approx \frac{(\Delta T_{propagation}^2 + L^2/4)}{\alpha N} \quad (4.17)$$

avec $\alpha = \frac{L}{t_{max} - t_{min}}$ désignant la proportion de photons conservés par le fenêtrage temporel.

A cette incertitude s'ajoute l'erreur de quantification due au balayage temporel que l'on peut représenter par $\frac{\delta t^2}{12\alpha N}$ par analogie avec le TCSPC.

Pour minimiser cette erreur totale, il convient en premier lieu de choisir le pas de balayage δt de telle sorte que sa contribution au bruit soit petite devant la propagation :

$$\frac{\delta t^2}{12\alpha N} \ll \frac{\Delta T_{propagation}^2}{\alpha L.N} \quad (4.18)$$

soit :

$$\delta t \ll 2\sqrt{3}\Delta T_{propagation} \quad (4.19)$$

On doit donc choisir un pas de balayage très petit devant la largeur de la distribution temporelle pour éviter de dégrader la précision de la mesure. On remarquera que cette inéquation est similaire à celle donnant le pas de quantification optimal dans le cas d'une chaîne TCSPC. On pourra donc reprendre la figure 4.2 page 132 pour déterminer le pas de balayage temporel optimal en fonction du type de tissu.

4.2.2 Largeur optimale de la fenêtre temporelle d'un HRI

La largeur optimale de la fenêtre temporelle doit être choisie de façon à minimiser les termes d'incertitude restant dans l'équation 3.29. Il s'agit donc de déterminer L pour minimiser l'expression :

$$\frac{(\Delta T_{propagation}^2 + L^2/4) \cdot (t_{max} - t_{min})}{N.L} \quad (4.20)$$

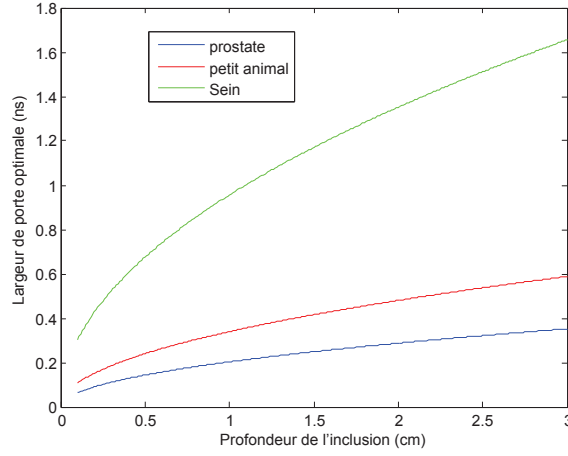


FIGURE 4.3 – Largeur de fenêtre d’un système de HRI, optimale pour la minimisation de l’incertitude de mesure des temps de vol.

Cela revient à minimiser :

$$\frac{\Delta T_{propagation}^2 + L^2/4}{L} \quad (4.21)$$

Le minimum de cette fonction étant atteint lorsque sa dérivée s’annule, on obtient :

$$-\frac{\Delta T_{propagation}^2}{L} + \frac{L}{4} = 0 \quad (4.22)$$

soit :

$$L_{optimal} = 2\Delta T_{propagation} \quad (4.23)$$

On choisira donc *une largeur de porte correspondant au double de la dispersion des photons dans le milieu*. Cette largeur de porte est un compromis entre la nécessité de collecter un maximum de photons pour rendre la mesure plus précise, et la dégradation de la résolution temporelle consécutive à la largeur de la porte. La figure 4.3 montre les largeurs de porte optimales en fonction de la profondeur de l’inclusion et pour différents types de tissus.

On constate que pour les tissus fortement absorbants (prostate), la largeur de porte minimale accessible sans utiliser le mode « GOI » (300 ps) est bien adaptée à la localisation d’une inclusion quelle que soit sa profondeur. Dans le cas du sein, l’augmentation de $\Delta T_{propagation}^2$ avec la profondeur impose de régler la largeur de porte en fonction de la profondeur estimée de l’inclusion. En l’absence de connaissance a priori sur cette profondeur, on pourra utiliser comme compromis une largeur de porte proche de 1 ns.

Enfin, dans le cas d’examens pour lesquels le temps d’intégration et donc le nombre de photons collectés ne constituent pas une limite, on choisira la plus petite largeur de porte technologiquement accessible, typiquement 100 ps, en utilisant s’il est disponible le mode « GOI ».

4.3 Bilan des chapitres 1, 2, 3 et 4

En établissant le lien direct qui existe entre le temps de vol moyen et la position spatiale de l'inclusion, nous avons montré l'apport de la mesure des temps de vol en matière de résolution et de sensibilité. Cette étude nous a permis d'établir les bases théoriques du calcul d'incertitude sur les mesures d'intensité et de temps de vol moyen.

Le premier problème traité dans cette partie consistait à déterminer le dispositif expérimental permettant d'obtenir la meilleure précision de mesure de l'intensité et du temps de vol moyen. Nous avons comparé la sensibilité et la précision de mesure du temps de vol offerts par un système de HRI et une chaîne TCSPC. Il est apparu que la résolution temporelle des appareils constitue rarement une limitation de la précision de mesure des temps de vol. En revanche, la sensibilité est un critère important, car plus le nombre de photons collectés est grand et meilleure sera la précision de mesure du temps de vol. Au-delà d'une certaine profondeur, la résolution temporelle des détecteurs devient un critère pouvant être complètement négligé devant la dispersion temporelle des photons due à la diffusion dans les tissus.

Le HRI offre la meilleure précision de mesure pour les applications où le temps d'intégration n'est pas une contrainte, et celles impliquant de visualiser des objets peu profonds, dans des milieux faiblement absorbants comme le petit animal. En revanche, la chaîne TCSPC, par sa capacité à prendre en compte tous les photons détectés, donne de meilleurs résultats pour les inclusions profondes situées dans des milieux plus épais et fortement absorbants.

Cette analyse nous a conduits à déterminer comment choisir la largeur de canal optimale d'une chaîne TCSPC, le pas de balayage et la largeur de la fenêtre temporelle optimaux d'un HRI afin de mesurer l'intensité et le temps de vol moyen avec une précision suffisante et à moindre coût.

Dans une dernière étape, nous allons mettre en pratique ces résultats pour répondre à une problématique médicale particulière : la localisation de lésions (tumeurs) marquées, en vue d'améliorer la fiabilité du diagnostic du cancer de la prostate.

Chapitre 5

Perspectives : application de la tomographie de fluorescence résolue en temps au diagnostic du cancer de la prostate

5.1 Problématique

Le diagnostic du cancer de la prostate et le déclenchement d'une thérapie sont aujourd'hui établis à partir de l'étude histologique de biopsies. Ces biopsies sont prescrites en fonction de signes cliniques du patient et de dosages élevés de l'hormone PSA (pour « Prostate Specific Antigen ») dans le sang . Les prélèvements des biopsies sont la plupart du temps guidés par l'échographie à ultrasons qui permet de cartographier la prostate, mais elle ne fournit pas d'information de localisation précise pour cibler les zones potentiellement cancéreuses.

Les 12 prélèvements opérés sont particulièrement difficiles pour le praticien et douloureux pour les patients. Néanmoins, dans 30% des cas environ, les biopsies prélevées ne contiennent pas de cellules tumorales, entraînant alors une deuxième voire une troisième série de prélèvements, pouvant retarder de plusieurs mois ou de plusieurs années l'établissement du diagnostic. Une augmentation du nombre de biopsies pratiquées entraîne un risque important d'effets secondaires.

Pour améliorer la pertinence du diagnostic, plusieurs approches sont actuellement en cours de développement. Les principales sont l'IRM et l'élastographie. La tomographie de fluorescence semble également une voie prometteuse car elle combine l'avantage d'un taux de contraste élevé (supérieur aux méthodes endogènes), et la parfaite compatibilité avec l'acte de biopsie qui ne peut être réalisé sous IRM. Plusieurs marqueurs ont été développés pour cibler les cellules prostatiques, en s'appuyant sur différentes techniques de vectorisation : certains ciblent le PSA membranaire [87, 88], d'autres utilisent l'assimilation importante du zinc par les tumeurs prostatiques [89], ou la formation de vaisseaux sanguins en périphérie des tumeurs (néoangiogénèse) [27]. Il est également possible d'exploiter le défaut des cellules endothéliales des vaisseaux sanguins présents

à la périphérie des tumeurs (« Enhanced Permeability and Retention effect » ou effet EPR) qui entraîne dans celles-ci l'accumulation des molécules d'une certaine taille.

Toutefois, il n'existait pas, jusqu'à présent, de système permettant de localiser l'accumulation d'un tel traceur fluorescent dans une prostate humaine.

Pour répondre à ce besoin, un consortium comprenant un Centre Hospitalier, plusieurs laboratoires français, et deux industriels ¹ a développé un système de sonde bimodale combinant imagerie de fluorescence résolue en temps et échographie pour localiser des tumeurs prostatiques marquées et guider l'outil de biopsie. Une image échographique réalisée simultanément permet de situer l'accumulation du marqueur par rapport à la morphologie de la prostate. A l'aide de cette double information, le praticien peut alors diriger l'outil de biopsie vers la tumeur afin de réaliser un diagnostic plus pertinent.

5.2 Dispositif expérimental

Le dispositif expérimental est décrit en détail dans deux articles de référence [90, 71]. Il est constitué d'une sonde endorectale incluant un module optique et un module ultrasonore, d'un laser pulsé et d'une chaîne de détection TCSPC multivoies.

Sonde bimodale

La sonde bimodale contient un module ultrasonore (128 éléments, fréquence centrale 6,5 MHz) autour duquel sont disposées six fibres optiques d'excitation et quatre de détection, comme le montre le schéma 5.1. Deux ergots permettent d'y adapter une aiguille de biopsie standard. Cette sonde a été rendue étanche afin de supporter les protocoles de décontamination entre chaque patient.

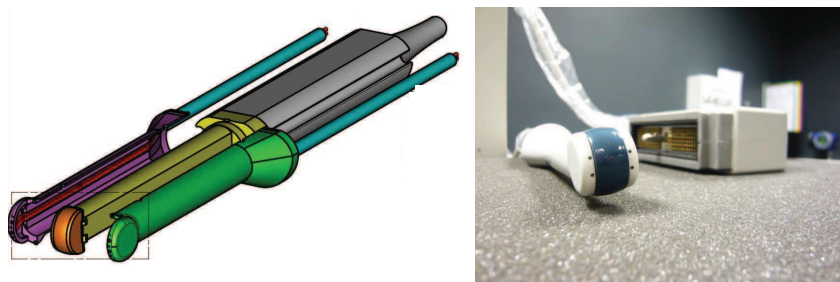


FIGURE 5.1 – Schéma et photo de la sonde bimodale. Module ultrasonore en jaune et orange ; module optique en vert et violet.

Système de détection résolu en temps

La figure 5.2 montre le système complet basé sur une chaîne TCSPC à quatre voies, qui s'avère être plus adapté à cette application comme nous l'avons montré à la page 125.

1. Le CHU de Bordeaux, les laboratoires LISA du CEA-LETI de Grenoble, CREATIS de l'INSA de Lyon et le LCFIO de l'Institut d'Optique de Palaiseau, ainsi que les sociétés VERMON S.A. (Tours) et AMPLITUDE SYSTEMES (Bordeaux).

Ce projet (PROSTAFLUO) est financé par l'ANR Technologies pour la Santé.

Pour cette application en effet, le coefficient d'absorption du tissu est très élevé et les inclusions que l'on doit détecter peuvent être situées en profondeur, jusqu'à 3-4 cm. Les inclusions proches de la paroi rectale sont généralement accessibles au toucher rectal ce qui rend leur détection plus aisée.

Un laser à fibres dopées Erbium produit des impulsions de 10 ps à 770 nm avec un taux de répétition de 50 MHz. Ce type de source, inspiré des technologies télécom, est plus compact et moins onéreux qu'un laser femto-seconde et donc plus compatible avec un environnement médical.

La lumière du laser est dirigée vers la prostate dans l'une des six fibres d'excitation de la sonde bimodale à l'aide d'un coupleur optique. Quatre fibres de détection collectent le signal de fluorescence et le dirigent, après filtrage vers quatre photomultiplicateurs connectés à quatre cartes TCSPC. Le temps d'intégration est fixé à une minute par voie d'excitation, pour une durée totale d'examen de 6 minutes. Nous mesurons également les signaux de diffusion en remplaçant les filtres de fluorescence par des densités neutres.

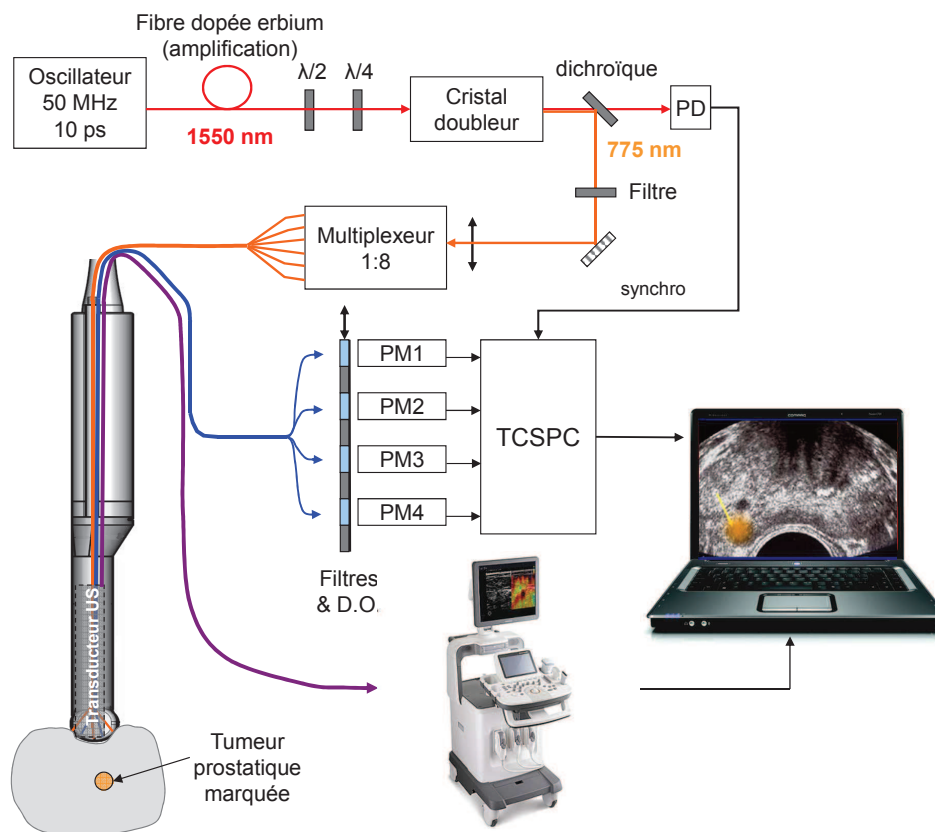


FIGURE 5.2 – Schéma de la partie optique du système de mesure par temps de vol (en version TCSPC).

On calcule alors l'intensité et le temps de vol moyen des 24 distributions temporelles de fluorescence et de diffusion. Ces valeurs servent de données d'entrée à l'algorithme décrit page 89 pour localiser une inclusion fluorescente unique ou double.

Pour évaluer la capacité du système à localiser précisément une inclusion, nous réalisons une première série d'essais sur un fantôme simulant à la fois les propriétés optiques et ultrasonores d'une prostate humaine, en se basant sur les valeurs d'absorption et de diffusion obtenues sur 10 volontaires sains, dans le cadre d'une étude menée par l'Université de Lund (Suède) [91]. Ce fantôme, réalisé à partir d'oxyde de titane, d'encre, de silice et d'une matrice dont l'élasticité dépend du nombre de cycles de congélation qu'on lui a faits subir, est décrit en détail dans le brevet (FR0904476).

5.3 Résultats

Comparaison de la durée d'acquisition par HRI et TCSPC

Nous avons comparé le taux de comptage des deux chaînes de détection pour un signal fluorescent provenant d'une inclusion située à 1 cm dans le fantôme de prostate. Nous avons également comparé la durée totale nécessaire à l'obtention des 24 distributions temporelles. Le critère est l'obtention d'un nombre identique de photo-événements fixé arbitrairement à $N = 10^6$. Les taux de comptage et les temps d'intégration apparaissent sur le tableau suivant :

	HRI	TCSPC
taux de comptage (photons/s)	550	8300
durée de la mesure (minutes)	30	2

Le flux de signal, relativement faible, s'explique par le coefficient d'absorption élevé de la prostate ($\mu_a = 0,4 \text{ cm}^{-1}$). Nous constatons également que la durée globale d'acquisition est beaucoup plus courte avec la chaîne TCSPC. La différence de sensibilité, représentée par le taux de comptage, est en accord avec la proportion de photons perdus par le HRI, établie page 103 (équation 2.19).

Dans le cas de l'examen de la prostate, fortement invasif, cette étude confirme le choix d'une chaîne TCSPC pour limiter la durée d'acquisition. Les résultats que nous allons présenter maintenant sont donc obtenus avec ce type de détecteur.

Précision et reproductibilité de la localisation de l'inclusion

Pour évaluer la précision de localisation, nous déplaçons une inclusion fluorescente selon un pas régulier et suivant les trois axes. La figure 5.3 montre la comparaison entre la position réelle de l'inclusion et sa position reconstruite.

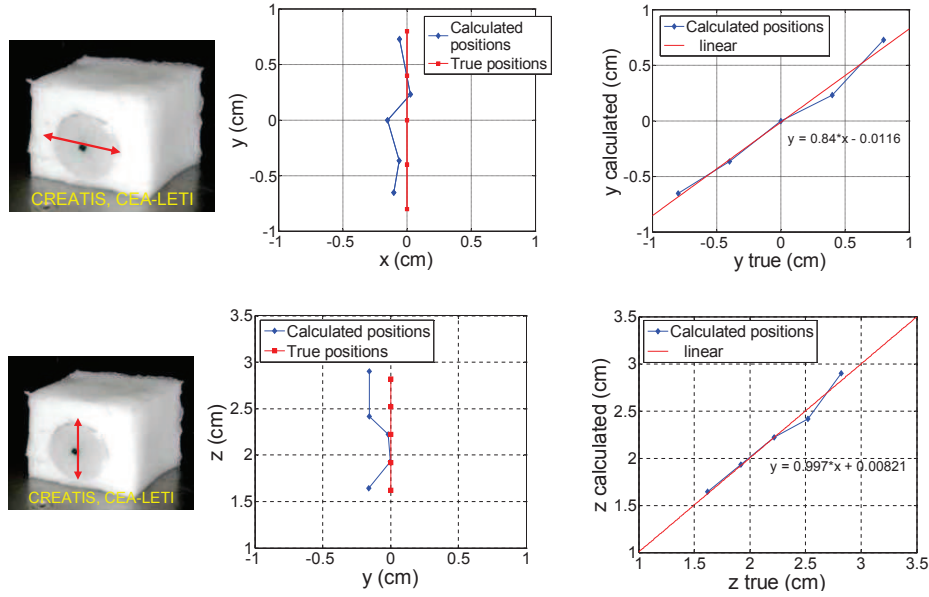


FIGURE 5.3 – Comparaison de la position réelle de l'inclusion avec la position reconstruite par la mesure optique.

Nous constatons une précision de localisation comprise entre 0,8 et 1,5 mm, ce qui apparaît compatible avec le guidage d'un outil de biopsie. La reproductibilité de la localisation d'une inclusion immobile est proche de 1 mm. L'inclusion a pu être localisée jusqu'à 28 mm, ce qui correspond à la profondeur de la majeure partie (80%) des tumeurs prostatiques.

Pour confirmer la précision de localisation, nous avons superposé les reconstructions optiques de l'inclusion avec l'image échographique acquise en même temps que les données optiques. Nous avons observé une bonne coïncidence de la position de l'inclusion déterminée par les deux modalités dans 4 cas sur 5 (80%).

5.3.1 Evaluation préclinique

Pour valider la capacité du système à localiser une accumulation de traceur fluorescent dans un organisme vivant, nous avons évalué la sonde sur trois souris portant une tumeur de type xénogreffe, et sur une souris saine. Le protocole consiste à implanter puis à laisser croître une xénogreffe dans le dos de la souris, puis à injecter une nano-émulsion d'ICG (Lipidots [92]).

Les mesures optiques sont réalisées juste après l'injection, puis 3 et 15 heures après. Lors d'une acquisition, la souris anesthésiée est placée dans un bain d'intralipide et d'encre simulant les propriétés optiques d'une prostate humaine. La sonde bimodale est alors placée en contact avec la partie ventrale de la souris, de telle sorte que la tumeur se retrouve en opposition par rapport à la sonde. On réalise alors une première image ultrasonore, puis une acquisition des 24 signaux de fluorescence et de diffusion. Ensuite, on fait tourner la souris d'un quart de tour pour vérifier que l'on détecte bien

le changement de position de l'inclusion après reconstruction. Pour corriger les données du signal d'auto fluorescence, on soustrait les signaux mesurés avant l'injection à ceux obtenus après celle-ci.

Les résultats obtenus (figure 5.4) montrent une bonne correspondance entre l'accumulation de fluorescence obtenue après reconstruction et la position théorique de la tumeur dans 75% des cas 3 heures après l'injection.

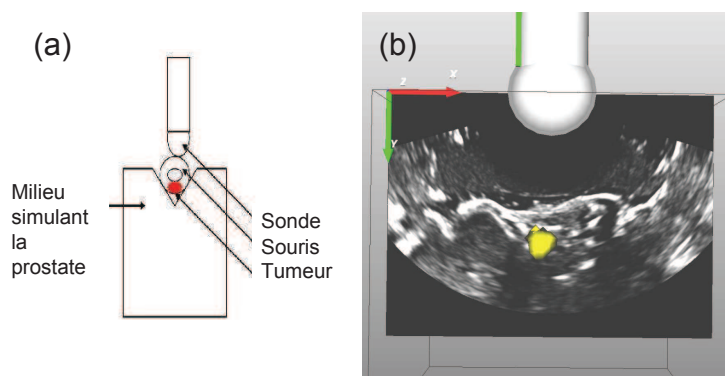


FIGURE 5.4 – (a) Schéma de principe de l'essai préclinique de la sonde montrant la position relative de la sonde, de la souris et de la tumeur.

(b) Superposition de l'image ultrasonore (nuances de gris) et de la localisation 3D de l'accumulation du traceur fluorescent obtenue par la mesure optique (jaune).

Dans le cas de la souris saine, nous avons constaté l'apparition d'un artefact dû à une tendance de la méthode à converger vers le barycentre de l'accumulation de traceur.

Ce test a néanmoins mis en évidence l'apport considérable de la mesure optique à l'échographie, qui n'est pas parvenue seule à localiser les tumeurs. Lors de futurs essais, le protocole pourrait être amélioré en plaçant près de la tumeur un élément échogène (capillaire en verre par exemple), ce qui permettrait de comparer directement la position de la tumeur obtenue par les deux modalités.

5.4 Conclusion du chapitre 5

Les travaux sur l'optimisation d'une chaîne de mesure résolue en temps ont abouti à un système permettant de *localiser une inclusion fluorescente avec une précision millimétrique dans un milieu très absorbant comme la prostate*. Nous avons vu que l'utilisation d'une chaîne TCSPC est particulièrement appropriée à une problématique de signal faible/temps d'exposition limité puisqu'elle permet de réduire la durée des mesures d'un facteur 15.

Cette étude a également montré que la tomographie optique de fluorescence et les ultrasons sont deux modalités très complémentaires, l'une apportant des informations fonctionnelles (localisation des tumeurs) et l'autre, morphologiques (distinction des contours de la prostate, rectum, tissus périphériques).

La profondeur maximale d'investigation, évaluée à 28 mm, correspond à la majeure partie des tumeurs prostatiques, 80% des tumeurs étant dans la zone périphérique. Pour détecter et localiser des tumeurs de la région postérieure, il est envisageable d'introduire une fibre optique dans l'urètre afin d'illuminer la prostate par l'arrière. Ceci a déjà été réalisé avec succès sur un chien dans le cadre d'essais en imagerie photoacoustique [93].

En 2012, cette sonde bi-modalité sera évaluée sur des volontaires sains dans le cadre de la plateforme OPTIC CLINIC située au CHU de Grenoble. Ces premiers essais permettront de collecter des données sur les propriétés optiques de la prostate afin de renforcer la fiabilité de la méthode et d'introduire l'instrument dans un environnement clinique. Ils permettront également de rendre la sonde compatible avec la réglementation régissant les dispositifs médicaux évalués en clinique.

Parallèlement à cette étude, le projet ANR BiTum (Biopsies Tumorales) permettra de comparer les performances précliniques de différents marqueurs fluorescents de la prostate et d'identifier le marqueur le plus pertinent. Dès que celui-ci aura démontré sa pertinence et son innocuité, il pourra être évalué sur des patients à l'aide de la sonde bimodale, dans le cadre d'un essai clinique de phase II.

Conclusion générale

Nous avons ainsi défini l'architecture et les conditions d'utilisation optimales d'un tomographe de fluorescence continu et résolu en temps.

Les systèmes précliniques de tomographie continue antérieurs permettent d'observer des pathologies dans l'abdomen ou le cerveau, organes dont le coefficient d'absorption est faible. Mais dans les organes plus absorbants comme le foie ou les poumons ces systèmes ne donnent pas de résultats satisfaisants. Or, il est indispensable de pouvoir localiser des inclusions fluorescentes dans ces organes car c'est souvent dans ceux-ci que se fixent les métastases.

Pour résoudre ce problème, nous avons en premier lieu déterminé pour le petit animal les longueurs d'onde de travail optimales permettant de traverser les tissus fortement absorbants. La notion de fenêtre thérapeutique apparaît insuffisamment précise dès que l'on vise les organes les plus absorbants d'un animal. En mesurant le spectre de transmission d'une souris, et en tenant compte de l'offre technologique existante, nous avons défini les longueurs d'onde de travail optimales, ainsi qu'un ensemble de composants : laser, fluorophore, filtres, permettant de traverser la cage thoracique d'un petit animal.

Puis, en mesurant le niveau du signal de fluorescence émis par des tumeurs pulmonaires, nous avons démontré que les caméras utilisées dans les systèmes existants ont souvent une dynamique inutilement élevée et une température de refroidissement excessivement basse. A l'aide d'une analyse photométrique précise des sources d'incertitude d'une chaîne tomographique typique, nous avons pu identifier les caractéristiques d'une caméra adaptée à la mesure tomographique sur petit animal. Celle que nous avons utilisée, bien moins onéreuse que celles qu'emploient d'autres équipes, demeure néanmoins parfaitement adaptée à l'intensité produite par une tumeur pulmonaire. Nous avons également montré que les critères les plus importants pour réaliser une mesure précise sont le choix du fluorophore, la stabilité du laser et la distance de travail.

L'étude de la dynamique d'un cas biologique réel nous a permis de mettre en évidence l'hétérogénéité importante des propriétés optiques du petit animal. Cette hétérogénéité a pour conséquence des différences de signaux considérables d'une image tomographique à l'autre. Ce problème a été traité simplement en mettant en place une procédure d'optimisation automatique des temps d'acquisition au niveau du signal d'intérêt. Cette procédure a permis d'améliorer la dynamique de mesure d'un facteur 130, nous affranchissant de la nécessité une caméra à forte dynamique.

Après avoir défini les éléments optimaux d'un système de tomographie préclinique, nous l'avons associé à une méthode de reconstruction pour évaluer ses performances

sur des tissus de faible épaisseur. La résolution a été évaluée sur fantôme à 1 mm suivant le plan de balayage et 3 mm en profondeur. La concentration minimum que nous avons pu détecter in vivo, 90 nM, montre que la sensibilité de notre tomographe est supérieure d'un ordre de grandeur à celle des systèmes antérieurs et comparable à celle d'un scanner micro-PET.

Enfin, nous avons montré la capacité du système à quantifier une concentration de fluorophore in vivo en réalisant le premier suivi d'évolution de tumeurs pulmonaires sur petit animal.

Ce tomographe a depuis lors été dupliqué en cinq exemplaires qui sont actuellement utilisés dans différents laboratoires de biologie. L'un de ces appareils a permis à une équipe de l'IMF (Bordeaux) de montrer la bonne correspondance entre la position de tumeurs cérébrales reconstruites en fluorescence et leur image morphologique observée à l'aide d'un IRM [57]. Un autre système, installé à l'Institut Albert Boniot de Grenoble, est utilisé quotidiennement pour tester de nouveaux médicaments contre le cancer [58]. L'équipe du Service Hospitalier Frédéric Joliot d'Orsay a également montré que la sensibilité du tomographe était supérieure de plusieurs ordres de grandeur à celle d'un autre tomographe commercialisé servant de référence [54, 68].

Enfin pour faire face à une demande croissante, ce système est actuellement en cours de transfert industriel à une société française.

La tomographie continue a donc désormais atteint une maturité suffisante dans le domaine préclinique pour prétendre rivaliser avec les techniques d'imagerie traditionnelles ou les compléter.

En revanche, comme nous l'avons montré, la tomographie de fluorescence continue ne peut être transposée directement à l'étude des tissus plus épais, même dans une géométrie favorable (en transmission). L'origine de la difficulté n'est pas un manque de sensibilité car celle-ci demeure suffisante pour des tissus faiblement absorbants (sein) : elle se situe au niveau de la résolution en profondeur qui vaut 8 mm dans le plan du balayage et 28 mm en profondeur pour une épaisseur de 5 cm de ce type de tissu.

Pour transposer à des tissus plus épais la tomographie de fluorescence, nous sommes passés à une instrumentation et à une méthode résolue en temps. Cette méthode de localisation développée par le laboratoire LISA repose sur la mesure de l'intensité et du temps de vol moyen du signal de fluorescence.

Nous avons comparé les performances respectives de deux grandes approches instrumentales pour mesurer ces deux grandeurs : l'approche par caméra rapide intensifiée munie d'un fenêtrage temporel, et l'approche par comptage de photons (TCSPC). Il nous est apparu que pour les tissus épais, et tant que l'on reste dans le domaine de la fluorescence, c'est l'approche TCSPC qui permet la mesure la plus précise des temps de vol moyens. Celle-ci l'emporte sur la caméra rapide, non pas en raison d'une meilleure résolution temporelle mais de sa plus grande sensibilité. En effet, plus on collecte de photons et plus la mesure du temps de vol moyen est précise. La caméra rapide intensifiée, pénalisée par le fenêtrage temporel, exclut une part importante des photons utiles, ce qui accroît l'influence du bruit photonique.

En analysant et en modélisant les sources d'incertitude des deux systèmes d'acquisition, nous avons pu proposer une méthodologie d'optimisation des paramètres d'ac-

quisition : la largeur de la fenêtre temporelle et le pas de balayage du HRI, ainsi que la largeur des canaux temporels du TCSPC. Cette méthodologie, basée sur la théorie de la quantification, permet d'obtenir au moindre prix la précision de mesure la plus adaptée au signal dont on souhaite déterminer l'intensité et le temps de vol moyen. Elle permet également de réduire la durée d'acquisition, pour un niveau d'erreur identique.

Cette technique d'optimisation a été appliquée à une problématique médicale concrète : le guidage des biopsies prostatiques par localisation d'un marqueur fluorescent spécifique. Pour cela, nous avons développé une sonde bimodale combinant imagerie de fluorescence résolue en temps et échographie. L'optimisation de l'instrumentation résolue en temps a notamment permis de réduire d'un facteur quinze la durée d'acquisition du signal, rendant la méthode moins invasive pour le patient. Cette nouvelle approche a été validée sur des fantômes simulant les propriétés optiques d'une prostate humaine. Ces essais ont notamment permis de quantifier l'erreur de localisation de l'inclusion, inférieure à 1,5 mm dans les trois axes, ce qui représente une amélioration proche d'un facteur 10 par rapport aux méthodes continues.

L'instrumentation étant désormais disponible et optimisée, il devient possible d'envisager de réaliser des études cliniques, dès lors que les marqueurs fluorescents auront prouvé leur efficacité et leur innocuité. Plusieurs projets de recherche débuteront en 2012, pour transférer la sonde bimodale et le système TCSPC dans l'environnement clinique du CHU de Grenoble, et pour comparer les performances précliniques de différents marqueurs prostatiques. Ces projets permettront d'évaluer plus précisément le bénéfice/risque de la tomographie de fluorescence résolue en temps, ouvrant la voie à des études cliniques à grande échelle.

La problématique de la prostate n'est pas la seule pouvant bénéficier du potentiel de la tomographie résolue en temps : les deux systèmes que nous avons mis en place (HRI et TCSPC) peuvent être utilisés pour d'autres applications telles que la détection du cancer du sein, de la thyroïde, ou encore de la plaque d'athérome, moyennant une simple adaptation de la géométrie d'acquisition et du protocole de mesure, en s'inspirant des règles que nous avons édictées dans ce mémoire.

Annexes

Annexe 1 : Systèmes commercialisés destinés à l'imagerie optique du petit animal

Le table 1 dresse la liste des différents systèmes commercialisés permettant de réaliser des mesures optiques sur petit animal [41].

	FRI 2D	Tomographie 3D	Autre modalité
Night Owl (Berthold)	oui	non	Bioluminescence
Maestro (CRI)	oui	non	non
Kodak in vivo imaging (Carestream Health)	oui	non	RX
Pearl Imaging (LiCOR Bioscience)	oui	non	non
iBox (UVP)	oui	non	non
IVIS Spectrum (Caliper Life Science)	oui	oui continue	Bioluminescence
FMT 2500 LX (ViSEN Medical)	oui	oui continue	non
Optix MX3 (ART)	oui	oui résolue en temps	Bioluminescence

TABLE 1 – Liste des systèmes commercialisés d'imagerie de fluorescence préclinique [41].

Annexe 2 : Caractérisation de la caméra du tomographe continu pour déterminer si elle est adaptée à la mesure d'images tomographiques

La caméra mise en œuvre dans le tomographe est moins performante et moins onéreuse que celles utilisées par les systèmes commercialisés, mais elle est tout aussi efficace et optimisée pour la mesure du signal issu d'images tomographiques précliniques.

Le capteur, une caméra à transfert interligne C4742 d'Hamamatsu (ORCA-AG), est une matrice de 1344×1024 pixels de dimension $6,45 \times 6,45 \mu m^2$. Cela signifie que chaque pixel se comporte comme une photodiode et que la caméra est équipée d'un drain permettant d'évacuer les charges en excès en cas d'éblouissement.

Calcul de la résolution

La résolution des images 2D dépend de l'objectif (résolution optique) et du détecteur (résolution détecteur). La résolution totale correspond généralement à la moins bonne de ces deux résolutions.

Résolution optique

L'objectif monté devant la caméra possède une focale de $f = 25$ mm et on l'utilise à son ouverture maximale c'est à dire à $f/1$. Dans ces conditions, le diamètre de la pupille d'entrée vaut donc $D = 25$ mm. Le diamètre du disque d'Airy s'obtient [94] à l'aide de la formule :

$$w = \frac{2,44\lambda f}{D} \quad (1)$$

avec w désignant le diamètre d'Airy (diamètre du disque principal contenant 84% de l'énergie lumineuse du spot), λ la longueur d'onde de travail, et D le diamètre de la pupille d'entrée. A l'aide de cette formule, on obtient $w = 1,83 \mu m$ à $750 nm$.

Cette formule de conjugaison n'est valable que pour un objet placé à l'infini. Or, le tomographe fonctionne avec une distance de travail limitée à $35 cm$. Dans ce cas, le diamètre d'Airy devient [94] :

$$w = \frac{2,44\lambda f}{D} (\gamma + 1) \quad (2)$$

avec γ désignant le grandissement. Celui-ci est mesuré en déplaçant le laser sur un diffuseur de part et d'autre du centre optique d'une distance donnée (4 cm), et en mesurant sur le détecteur d'écart de la position du centre des tâches laser en nombre de pixels. On obtient un grandissement de $\gamma = 0,072$, ce qui ne modifie que faiblement le diamètre de la tâche d'Airy qui prend la valeur $w = 1,96 \mu m$. Rapportée dans le plan objet, le diamètre de la tâche d'Airy vaut donc $27 \mu m$.

Résolution détecteur

Elle correspond à la capacité des pixels du détecteur à distinguer 2 objets très proches indépendamment de l'ouverture de l'optique. La limite de résolution d'un capteur est

définie par la fréquence de Nyquist. Celle-ci, exprimée en paires de lignes par millimètres est obtenue par :

$$NF = \frac{1}{2 \times \text{largeur pixel}} \quad (3)$$

Ce qui correspond, pour des pixels de $6,45 \mu m$ à une fréquence de Nyquist de 78 pl.mm^{-1} .

La résolution globale du système d'imagerie 2D est donc limitée par le détecteur, comme c'est le cas dans la plupart des systèmes d'imagerie. Elle peut donc être estimée à $5,6 \text{ pl.mm}^{-1}$ ramenée dans le plan objet ($78 \text{ pl.mm}^{-1} \times \gamma$). Ramené dans le plan objet, la résolution vaut donc $178 \mu m$.

Sensibilité du détecteur

L'objectif de cette étude est de montrer que la sensibilité du détecteur est adaptée à la mesure d'images tomographiques. Pour cela, on doit caractériser la sensibilité du détecteur afin de montrer qu'elle n'est pas un élément limitant de la chaîne d'instrumentation.

La sensibilité S du détecteur permet d'établir le lien entre le flux de photons atteignant le capteur et le niveau de gris de l'image correspondante. Elle peut s'écrire [95] :

$$S = \eta G F \tau_W \quad (4)$$

avec η désignant le rendement quantique, G le nombre de niveau de gris par électron (gain électronique ou pas de quantification), F la fraction photosensible du pixel (coefficient de remplissage), et τ_W le coefficient de transmission de la fenêtre protégeant le capteur.

Le rendement quantique η correspond au nombre moyen d'électrons généré par photon. En raison des faibles énergies mises en jeu, ce nombre est toujours inférieur à un. Il dépend fortement de la longueur d'onde et est fourni par le constructeur. Néanmoins, celui-ci précise que de légères différences de rendement quantique peuvent exister entre les différents capteurs d'un même modèle. Nous avons réalisé des mesures en éclairant la caméra par un flux homogène en interposant entre la source blanche et la caméra des filtres passe bande étroits à différentes longueurs d'onde avec un pas de 50 nm . Ce protocole de caractérisation que j'ai mis au point en collaboration avec Michel Berger du LISA a fait l'objet d'un document interne utilisé par les membres du laboratoire LISA pour caractériser tout nouveau détecteur mis en œuvre dans nos projets. La figure 5 ci-dessous montre le dispositif permettant d'envoyer une lumière quasi-homogène sur le détecteur. Ce banc est constitué d'un tube de plastique noir de 1 m de long et d'une lampe à incandescence, alimentée par un générateur de tension continue réglable. Ce banc permet d'envoyer sur le détecteur un flux lumineux homogène dont les rayons sont perpendiculaires au capteur. Un diffuseur est placé devant la lampe afin d'accroître l'homogénéité de celle-ci. Un support à proximité de la source, permet de placer un dépoli et les différents filtres interférentiels. La caméra ou un photodétecteur calibré (Melles Griot) peuvent être fixés à l'autre extrémité du canon.

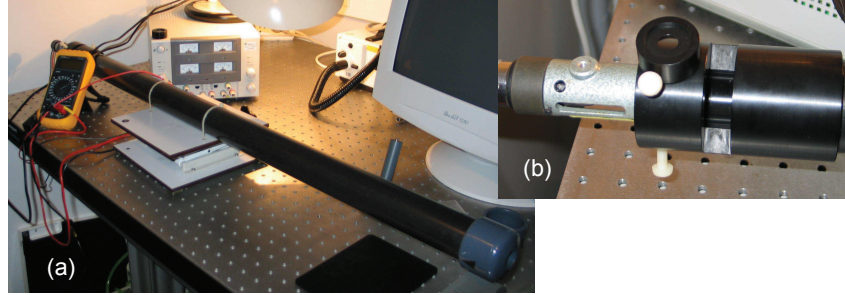


FIGURE 5 – Banc expérimental destiné à caractériser le détecteur. Ce tube est équipé d’une lampe et d’un diffuseur à une extrémité. Le détecteur que l’on souhaite caractériser est placé à l’autre extrémité. Ceci permet d’éclairer le détecteur à l’aide d’une lumière homogène et perpendiculaire à sa surface. Il est possible de remplacer le détecteur par un puissancemètre (Melles Griot) afin de calibrer le flux lumineux émis par la lampe.

Le résultat obtenu est normalisé par rapport au maximum de la courbe théorique fournie par le constructeur. La comparaison entre ces deux courbes est présentée sur la figure 6.

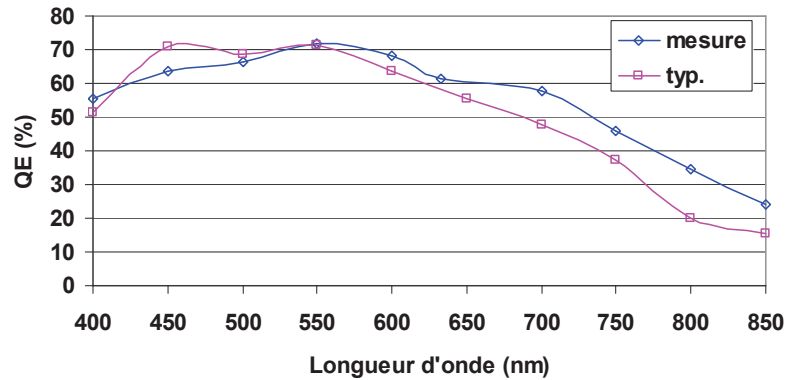


FIGURE 6 – Comparaison entre le rendement quantique de la caméra donné par le constructeur (typique) et celui obtenu à l’aide de nos mesures.

On constate un écart d’environ 10% entre le rendement indiqué par le constructeur et celui obtenu par nos mesures.

On constate sur la figure 6 que le rendement à 750 nm vaut 45%. Hamamatsu précise dans sa note technique que la valeur de rendement quantique tient compte également de la fenêtre de protection du capteur τ_W ainsi que du coefficient de remplissage des pixels F (fill factor) accru par une matrice de micro-lentilles.

Le gain électronique G n’est pratiquement jamais donné par le constructeur. Mais on peut le déterminer grâce à la relation linéaire entre la variance d’une image et l’intensité

moyenne de celle-ci $[95]^2$:

$$\text{var}(I) = G(I - I_{\text{noir}}) + \text{var}(I_{\text{noir}}) \quad (5)$$

Pour éviter une influence d'une différence éventuelle de sensibilité d'un pixel à l'autre, on évalue la $\text{var}(I)$ à l'aide de la différence de deux images I_1 et I_2 soumises au même éclairage. Le coefficient $1/2$ permet de compenser la superposition du bruit de ces deux images (superposition en moyenne quadratique).

$$\text{var}(I) = \frac{1}{2} \text{var}(I_1 - I_2) \quad (6)$$

Pour créer un flux lumineux le plus uniforme possible, on place la caméra sur un tube équipé à l'autre extrémité d'une lampe à incandescence de luminosité réglable, d'un diffuseur, et d'un filtre passe bande centré autour de 750 nm. On règle la puissance de la lampe à différentes valeurs afin de tracer la courbe de la figure 7. Celle-ci nous permet de déduire que le gain électronique est de :

$$G = 1/4, 2 = 0, 24 \text{ niveaux} \cdot e^{-1} \quad (7)$$

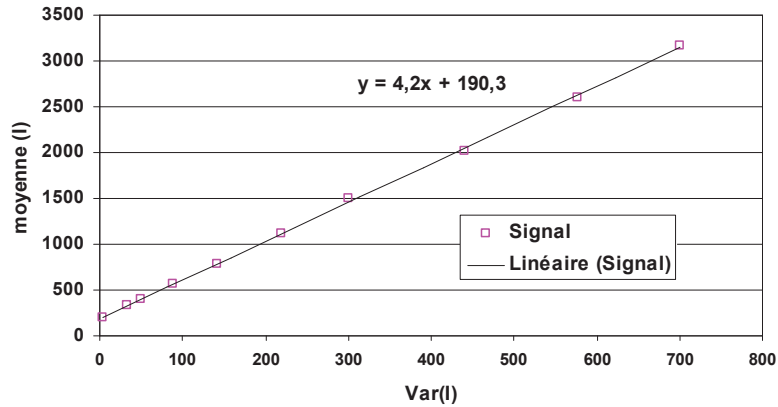


FIGURE 7 – Détermination du gain électronique de la caméra CCD obtenue en prenant une série de paires d'images à différents flux incidents. Le coefficient directeur de la droite de régression permet de remonter au gain électronique à l'aide de la formule 5.

Ayant déterminé le gain électronique G et le produit $\eta G F \tau_W$, on peut, à l'aide de la formule 4, déterminer la sensibilité du détecteur S :

$$S = 0, 108 \text{ niveau} \cdot \text{photon}^{-1} \quad (8)$$

Il faut donc approximativement *un flux de 10 photons incidents* sur un pixel de la caméra *pour générer un niveau de gris* à 750 nm.

2. Cette équation est vraie dans la mesure où le bruit photonique est le bruit majoritaire.

Cette valeur ayant été obtenue en partie à l'aide de données des constructeurs, nous la vérifions en réalisant une mesure comparative à l'aide d'un détecteur photométrique calibré (powermeter Melles Griot). La lampe à incandescence étant réglée à une puissance intermédiaire et filtrée par un filtre PB à $750\text{ nm} \pm 5\text{ nm}$, nous plaçons le photomètre à l'autre extrémité du tube et notons la puissance mesurée. A l'aide des dimensions de la photodiode, nous en déduisons le flux d'énergie lumineuse par unité de temps et de surface à l'extrémité du tube. Pour convertir ce flux en nombre de photons, nous utilisons la relation :

$$E_{\text{photon}} = \frac{h \times c}{\lambda} \quad (9)$$

avec $h = 6,62.10^{-34}\text{ m}^2.\text{kg}.\text{s}^{-1}$ la constante de Planck, $c = 3.10^8\text{ m}.\text{s}^{-1}$ la vitesse de la lumière dans le vide, et λ la longueur d'onde.

On multiplie ce nombre de photons par la sensibilité pour déterminer le niveau de gris que l'on devrait obtenir théoriquement et l'on compare celui-ci à celui qu'on obtient avec la caméra et un temps d'exposition de 1s. Le niveau de gris obtenu théoriquement (45%) apparaît sensiblement supérieur à celui mesuré expérimentalement (38%) ce qui peut s'expliquer par un rendement quantique légèrement inférieur à celui annoncé par le constructeur, ou la présence de poussières, ou d'interfaces optiques dont on n'aurait pas tenu compte.

Linéarité

L'étude de la sensibilité ne serait pas complète si on ne vérifiait pas la linéarité du détecteur. Pour cela, on éclaire le capteur d'une lumière homogène, et on augmente graduellement le temps d'exposition de manière à dresser la courbe de la figure 8.

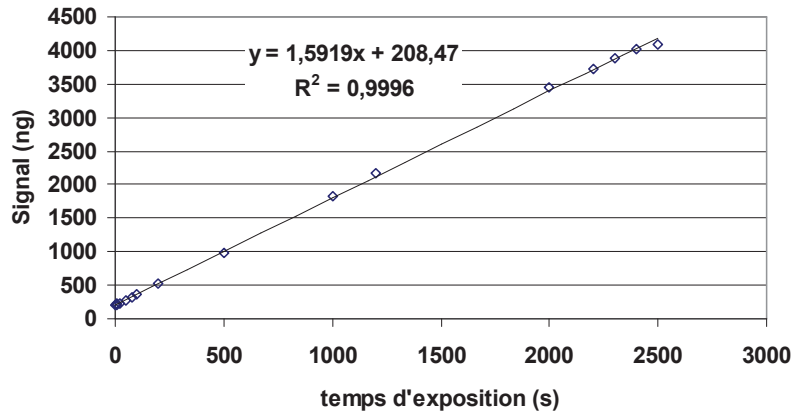


FIGURE 8 – Linéarité de la réponse de la caméra CCD

Le coefficient de régression linéaire de 0,9996 obtenu nous permet d'affirmer que la caméra donne une réponse parfaitement linéaire dans sa gamme dynamique, c'est à dire de 70 (offset) à 4095 (maximum du convertisseur analogique numérique).

Rapport signal sur bruit (SNR)

Les différentes sources de bruit sont les suivantes :

- le bruit de photons lié à la nature quantique de la lumière - obéit à une statistique de Poisson
- le bruit de lecture bruit du préamplificateur qui dépend de la vitesse de collecte des électrons
- le bruit d'obscurité lié à la nature quantique du courant d'obscurité.

Bruit photonique

Si on fait l'hypothèse que les bruits de lecture et d'obscurité sont négligeables devant le bruit photonique, alors le SNR est limité par la capacité de puits maximum du détecteur, qui vaut d'après le fabricant $N_C = 18000$ électrons. Ceci est cohérent avec la sensibilité estimée précédemment. En effet, 4095 niveaux correspondent à 37920 photons, soit $37920/2,4 = 15800$ électrons.

Comme chaque électron est généré par un photon, alors le nombre d'électrons N_e obéit également à une statistique de Poisson. Pour chaque niveau de signal N_e le SNR par pixel est limité par :

$$SNR = 20 \log \left(N_e / \sqrt{N_e} \right) = 10 \log (N_e) \quad (10)$$

Soit :

$$SNR_{max} = 10 \log (4095/G) = 42 \text{ dB} \quad (11)$$

Bruit de lecture et bruit d'obscurité La variance de ces bruits est obtenue en mesurant celle-ci sur la différence de deux images de noir en augmentant graduellement le temps d'exposition. Le bruit de lecture correspond à l'ordonnée à l'origine de la droite obtenue et le bruit d'obscurité à son coefficient directeur. On convertit ces valeurs en électrons pour obtenir :

$$Var(B_{lecture}) = 3,2 \text{ niveaux} \quad (12)$$

$$\sigma(B_{lecture}) = 7 \text{ electrons} \quad (13)$$

Le courant d'obscurité de ce détecteur vaut $0,03 \text{ electrons.s}^{-1}$ d'après le constructeur. L'écart type du bruit d'obscurité associé vaut donc $\sqrt{0,03 \times 10} = 0,17$ electrons, ce qui est négligeable aux temps d'exposition que nous utilisons couramment ($\leq 10 \text{ s}$).

On peut en conclure que le bruit photonique devient le bruit majoritaire pour tous les cas où le signal est supérieur à 3,2 niveaux, c'est à dire dans la très grande majorité des cas.

La figure 9 montre l'incertitude relative de mesure en fonction du niveau du signal.

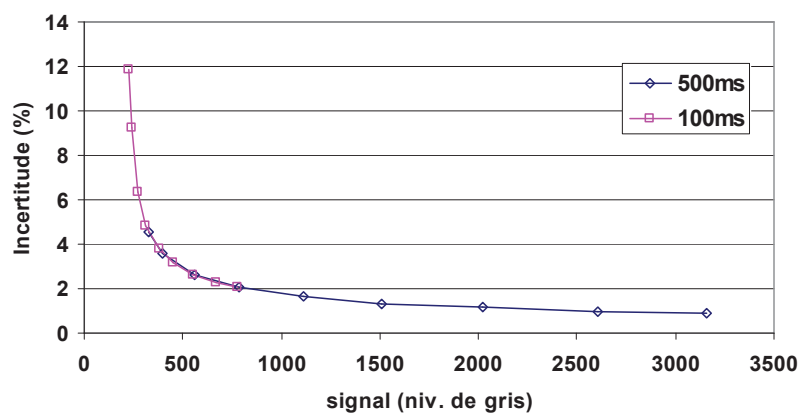


FIGURE 9 – Incertitude de mesure relative de chaque pixel en fonction du niveau du signal.

Pour un signal situé au milieu de la dynamique détecteur (2000 niveaux), l'incertitude de mesure sur chaque pixel est inférieure à 2%.

Annexe 3 : Méthode de numérisation des contours d'un animal

Suivant l'application visée, le petit animal peut être positionné suivant deux types de géométries :

- géométrie « à l'air libre » : l'animal est simplement posé sur une plaque de verre. Cette géométrie présente l'avantage de ne pas modifier la position des organes à l'intérieur de la souris, mais les mesures sont affectées par les mouvements respiratoires de celle-ci.
- géométrie « entre plaques » : l'animal est placé entre deux plaques de verre transparentes. Dans cette configuration, les mouvements respiratoires influent moins sur la mesure, la géométrie devient plus simple pour l'algorithme de reconstruction, et l'épaisseur de tissu traversée par la lumière est réduite, ce qui permet d'augmenter l'intensité du signal de fluorescence détecté. Elle est également uniforme.

Typiquement, les applications nécessitant une visualisation dans l'abdomen ou les poumons tireront donc parti de la géométrie entre-plaque, alors que l'imagerie du cerveau de l'animal sera préférentiellement réalisée en géométrie à l'air libre. Lors d'une étude impliquant une autre modalité d'imagerie (PET ou micro CT par exemple), il est préférable de travailler à l'air libre pour pouvoir superposer les résultats obtenus sur les différents appareils.

Géométrie à l'air libre

Balayage par un plan laser

En géométrie à l'air libre, les solutions commerciales de numérisation ne satisfaisant pas notre besoin, nous avons mis en place un système de numérisation 3D basé sur une diode laser à 535,5 nm (Stocker Yale modèle GLL-501L-532-5-45°) équipée d'une lentille cylindrique permettant de générer un plan laser à la surface de l'animal.

Numériser les contours avec un laser vert permet d'éviter la diffusion de la lumière à l'intérieur de l'animal, ce qui aurait pour conséquence une mesure imprécise. La diode laser est fixée sur la platine de translation orientée suivant l'axe x de manière à balayer l'ensemble du petit animal sans ajouter de moteur supplémentaire. Le balayage est réalisé d'une seule traite, sans arrêt du moteur. Une fois que la platine a atteint une vitesse constante, la caméra acquiert une image de la ligne laser déformée par le corps de l'animal à intervalles de temps réguliers. Cette image est traitée en temps réel par le logiciel de pilotage qui analyse la ligne laser et en déduit une cartographie des contours de l'animal à l'aide de la méthode suivante.

Méthode de numérisation

Pour chaque image, on mesure la distance P (en pixel) entre chaque point de la trace du laser et le bord latéral de l'image (voir fig 11(a)). On fait cette mesure pour chacune des colonnes de l'image. La grandeur P_0 correspond à la distance entre la ligne laser au sol et le bord latéral de l'image.

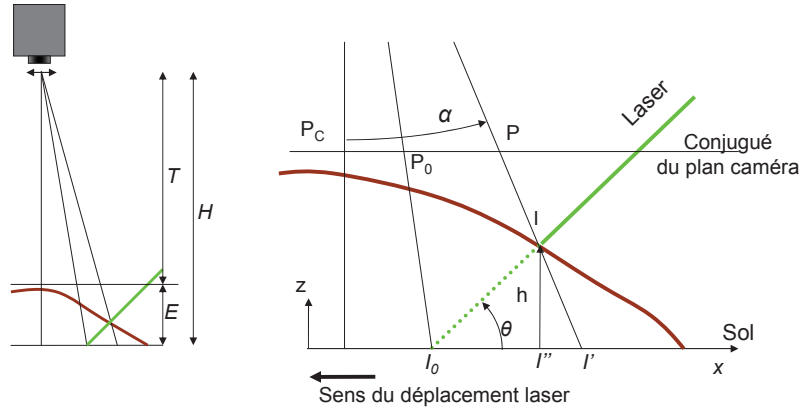


FIGURE 10 – Schéma du système de numérisation des contours de l’animal en géométrie « à l’air libre » par un plan laser. Le laser balaye l’animal dans le sens des x décroissants.

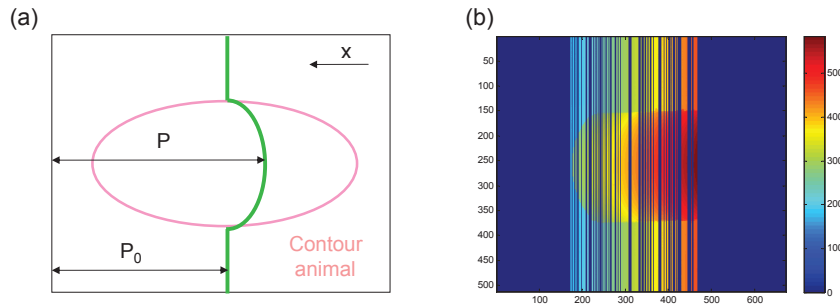


FIGURE 11 – (a) Schéma représentant l’image vue par le détecteur. En réalité, la caméra ne voit que la ligne laser, le reste de l’image étant plongé dans le noir. (b) exemple d’image d’altitude « brute », c’est à dire sans interpolation ni redressement.

L’ensemble de ces écarts est stocké sous la forme d’une « image d’altitude » représentative de la « hauteur » de la ligne laser au pixel donné. Pour cela, les positions P de la trace du laser sont stockées sous la forme de niveaux de gris dans la ligne P_0 de l’image d’altitude. La figure 11(b) montre un exemple d’une telle image obtenue en balayant un fantôme en demi-cylindre. Les pixels des colonnes pour lesquelles on n’a pas pris d’image sont laissés à la valeur 0. Sur les colonnes pour lesquelles une image a été prise, les valeurs des pixels varient en dégradé suivant l’axe x en raison du déplacement de la trace du laser.

Correction de l’image d’altitude

L’image d’altitude brute n’est pas exploitable en l’état : en raison de la géométrie d’acquisition, les niveaux de gris ne correspondent pas directement à l’altitude z des points de la surface balayée. Une correction, basée sur le calcul suivant doit être appli-

quée à l'image d'altitude.

Sur la figure 10, on définit les points suivants :

- I_0 l'intersection laser-sol
- I l'intersection laser-objet
- I' la projection de I sur le sol
- I'' la projection orthogonale de I sur l'axe des x (c'est l'abscisse de I)
- α l'angle entre la droite allant de la caméra au point I et la verticale
- θ l'angle d'incidence du laser
- h l'altitude du point I
- dx la taille d'un pixel caméra ramené dans le plan de focalisation (grandissement)
- P_c l'abscisse, exprimée en pixel, du centre optique.

Pour reconstituer la surface, on cherche à déterminer les valeurs $x(I)$ et $h(x)$.

Dans le plan de focalisation, on peut écrire :

$$\tan \alpha = \frac{(P - P_c) \times dx}{T} = \frac{(P - P_c) \times dx}{H - E} \quad (14)$$

Étant donné que $x = \tan \alpha \times H$ alors :

$$x_0 = x(I_0) = \frac{(P_0 - P_c) \times dx \times H}{H - E} \quad (15)$$

$$x' = x(I') = \frac{(P - P_c) \times dx \times H}{H - E} \quad (16)$$

On définit également $x = x(I)$

Dans le triangle I, I_0, I'' , on a :

$$h = (x - x_0) \cdot \tan \theta \quad (17)$$

Dans le triangle I, I', I'' , on a :

$$h = \frac{x' - x}{\tan \alpha} \quad (18)$$

D'où $x = x' - h \cdot \tan \alpha$. En reportant cette expression de x dans l'équation 17, on obtient :

$$h = [(x' - h \cdot \tan \alpha) - x_0] \cdot \tan \theta \quad (19)$$

Soit :

$$h = \frac{(x' - x_0) \tan \theta}{1 + \tan \alpha \tan \theta} \quad (20)$$

On rappelle que x peut être déduit de l'équation 17.

On dispose donc d'une expression de l'altitude z pour chaque point x de l'image, ce qui permet de corriger l'image d'altitude comme illustré par la figure 11(a).

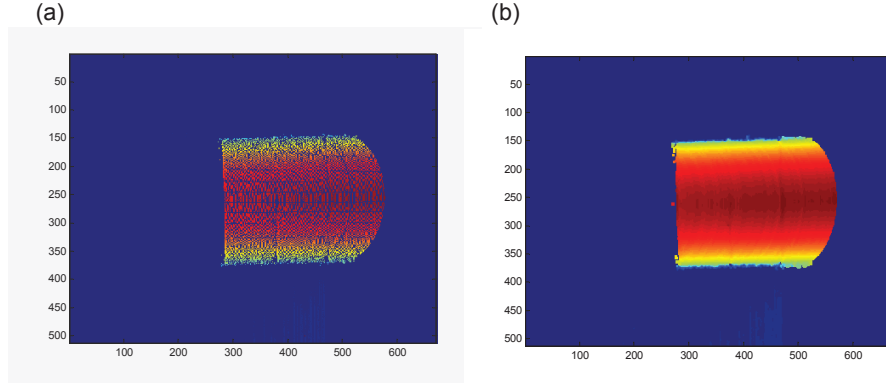


FIGURE 12 – (a) Image d'altitude corrigée (b) image d'altitude corrigée et interpolée.

Pour réaliser l'interpolation (combler les « trous » de l'image d'altitude), on calcule la convolution de l'image par une fenêtre que l'on divise par le masque de cette même fenêtre :

$$z_{interpolé}(x, y) = \frac{\sum_{x,y} z(x, y) \times Masque(x, y)}{\sum_{x,y} Masque(x, y)} \quad (21)$$

avec $Masque(x, y)$ désignant le masque de l'image, c'est à dire prenant pour valeur 1 pour les pixels non-nuls de $z(x, y)$ et 0 ailleurs.

Le résultat obtenu sur un fantôme cylindrique est montré sur la figure 11(b). L'ensemble de la procédure de numérisation des contours prend environ 15 s.

Géométrie entre-plaques

Dans cette géométrie, la numérisation est plus simple car on connaît déjà l'altitude d'une partie de l'animal. Il n'est donc pas nécessaire de balayer celui-ci avec le plan laser. En effet, la zone de l'animal qui est en contact avec la plaque supérieure a une altitude fixée par l'espacement entre les deux plaques de verre. Cet espacement, réglé par l'utilisateur à l'aide d'entretoises d'épaisseur calibrées est donc parfaitement connu. Déterminer l'altitude de l'animal revient donc principalement à localiser la partie de celui-ci qui est en contact avec le support. Pour cela, nous avons mis en place deux rangées de diodes électroluminescentes situées le long des flancs du petit animal. Ces LED éclairent uniquement les flancs tout en laissant la zone de contact dans l'ombre. On acquiert alors une image avec la caméra CCD, puis un algorithme de seuillage permet de segmenter la zone de contact et les bords de l'animal. L'altitude des contours de l'animal est approchée par une forme polynomiale.

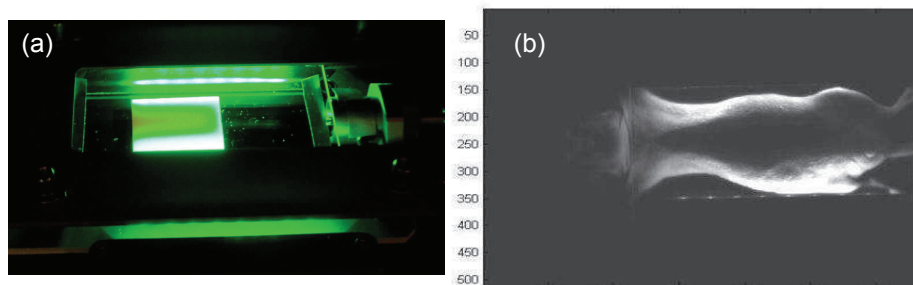


FIGURE 13 – (a) Rangées de LEDs vertes latérales utilisées pour numériser les contours de l'animal en configuration « entre plaques ».

(b) Image de contours d'une souris acquise avec la caméra CCD du tomographe. Dans les deux cas, la zone d'ombre correspond à la zone de contact entre la plaque de verre supérieure et l'animal, ce qui permet de la déduire à l'aide d'un seuillage.

Remarque : il est également possible d'utiliser le plan laser pour évaluer les contours de l'animal en géométrie entre-plaques. La réflexion du laser sur la plaque de verre peut en effet être négligée par rapport la diffusion sur la surface de l'animal. Cependant, la méthode des LEDs produisant un résultat similaire de manière quasi-instantanée, on la préfère à la méthode par balayage du plan laser.

Évaluation des performances du système de mesure des contours

La méthode de mesure des contours par le balayage laser est évaluée en balayant un fantôme en « escalier » dont on a calibré précisément la hauteur des marches. Ceci nous permet d'évaluer la précision de la mesure d'altitude.

Validation de la méthode de redressement du contour

Pour vérifier que la méthode que nous venons de décrire corrige correctement l'effet du grandissement sur la numérisation des contours, nous numérisons la surface d'un fantôme de forme demi-cylindrique. L'image 14 montre la différence entre les contours numérisés avec et sans correction.

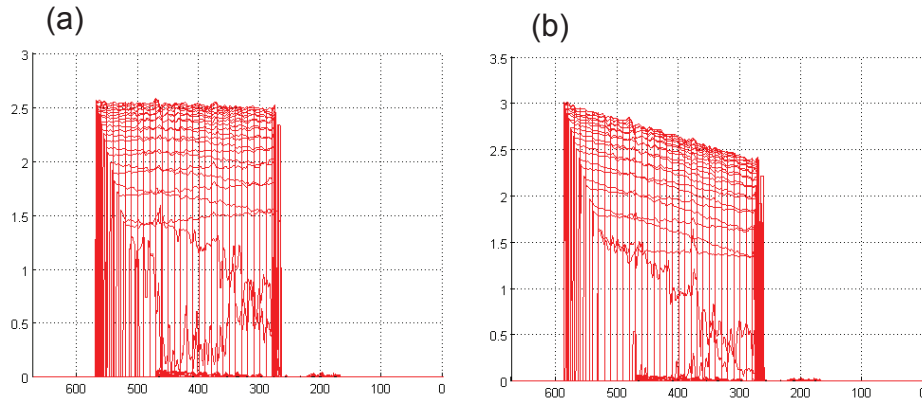


FIGURE 14 – Résultat de la numérisation de la surface d'un fantôme demi-cylindrique.
 (a) Numérisation réalisée avec correction de l'effet du grandissement.
 (b) Numérisation sans correction.

Linéarité et précision de la numérisation des contours

Pour réaliser cette évaluation, nous avons conçu un fantôme en forme de marches d'escalier de hauteur calibrée. Ce fantôme est constitué de 5 marches successives de 5 mm de hauteur et 10 mm de profondeur. Le résultat de la numérisation apparaît sur la figure 15.

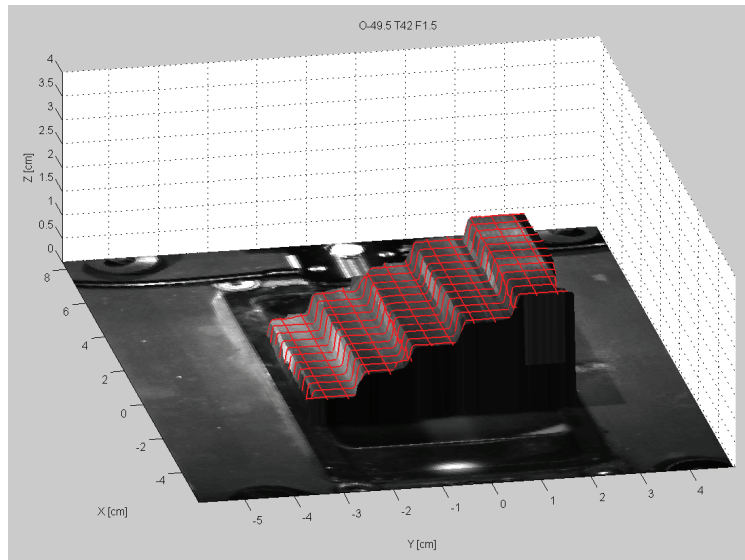


FIGURE 15 – Résultat de la numérisation d'un fantôme en forme de marches d'escalier de 5 mm de hauteur.

La précision est évaluée à $200\ \mu\text{m}$ en calculant l'écart type des altitudes sur chaque marche d'escalier. La linéarité est vérifiée en s'assurant que la relation entre l'altitude moyenne des marches d'escaliers numérisée suit une relation linéaire ce qui est le cas.

- La méthode de mesure des contours « sans plaque » est évaluée en comparant le résultat obtenu par les LEDs avec celle obtenue avec le balayage laser.
- Une évaluation in-vivo est réalisée sur une souris baignant dans l'intralipide, puis à l'air, avec et sans plaque.

Annexe 4 : Grandeurs mesurables en tomographie résolue en temps

Soit $U_{sd}^m(\vec{r}, t)$ le signal d'émission de fluorescence provenant d'une l'inclusion située en \vec{r} et mesuré par un détecteur résolu en temps. On peut écrire $U_{sd}^m(\vec{r}, t)$ comme la convolution de cinq processus successifs : l'émission de la source laser, la propagation de la source s à l'inclusion, le déclin de fluorescence, la propagation vers le détecteur en d , et la réponse du détecteur :

$$U_{sd}^m(\vec{r}, t) = (S_s \star G_s(\vec{r}) \star F(\vec{r}) \star G_d(\vec{r}) \star D_d)(t) \quad (22)$$

avec \star désignant le produit de convolution suivant t et :

- $S_s(t)$ représentant l'impulsion laser au point source s exprimée en [*photons*]
- $G_s(\vec{r}, t)$ et $G_d(\vec{r}, t)$ les fonctions de Green associées respectivement à la distance entre la source s et l'inclusion m puis entre la l'inclusion et le détecteur d , exprimées en [cm^{-2}]
- $F(t)$ la fonction représentant l'émission de fluorescence (déclin) en [cm^2]
- $D_d(t)$ la réponse du détecteur d à un Dirac temporel en [cm^2]

Pour simplifier les notations on peut écrire :

$$U_{sd}^m(t) = IRF_{sd}(t) \star \hat{U}_{sd}^m \quad (23)$$

avec $\hat{U}_{sd}^m(\vec{r}, t) = (G_s \star F \star G_d)(\vec{r}, t)$ correspondant à la réponse du milieu obtenue par un instrument parfait, et $IRF_{sd}(t) = (S_s \star D_d)(t)$ la réponse impulsionnelle de l'instrument à un Dirac temporel (Time Point Spread Function) pour le couple source détecteur d'indice s, d .

Les moments associés à ces fonctions correspondent à des grandeurs mesurables. Par exemple, dans le cas de la source lumineuse, on a :

- $S_s^{(0)}$ désigne l'énergie envoyée par le laser au point s pendant la durée d'acquisition
- $t_s = \frac{S_s^{(1)}}{S_s^{(0)}}$ représente le temps moyen mis par les photons émis par le laser pour atteindre la surface du milieu diffusant (trajet dans une fibre par exemple).

Dans le cas du fluorophore, à partir de la fonction $F(\vec{r}, t)$, on peut décliner :

$F^{(0)}(\vec{r})$ représente la proportion de photons réémis sous la forme de fluorescence. On peut écrire :

$$F^{(0)}(\vec{r}) = (\epsilon \times R_q \times C \times V)(\vec{r}) \quad (24)$$

avec ϵ l'absorption molaire [$cm^2.mol^{-1}$] , R_q le rendement quantique, C la concentration du fluorophore [$mol.cm^{-3}$] V_m le volume de l'inclusion [cm^3] et $\tau = \frac{F^{(1)}}{F^{(0)}}$ désignant la durée de vie du fluorophore [ns].

Enfin, dans le cas du détecteur, les grandeurs qui vont avoir une influence sur la mesure sont :

$D_d^{(0)} = \frac{\Omega \cdot dS}{4\pi} \times \eta$ représente la proportion de photons que le détecteur parvient à collecter et à comptabiliser, avec Ω le cône d'acceptance du détecteur, dS la surface de collection, et η la sensibilité du détecteur (proportion de photons incidents effectivement comptabilisés).

$\langle t_d \rangle = \frac{N_d^{(1)}}{N_d^{(0)}}$ représente le délai moyen entre le moment où un photon sort du milieu diffusant et sa comptabilisation par le détecteur.

Bilan des publications et brevets réalisés dans le cadre de la thèse

Publications dans des revues à comité de lecture

1. J. Boutet, M. Debourdeau, L. Hervé, D. Vray, O. Messineo, A. Nguyen Dinh, N. Grenier, JM. Dinten, « Fluorescence imaging to improve prostate cancer diagnosis », *Electronic Engineering Times*, 5/01/2012
2. J. Boutet, A. Koenig, L. Herve, M. Berger, V. Josserand, J-L. Coll, J-M Dinten, « Optical tomograph optimized for tumor detection inside highly absorbent organs », *Optical Engineering* 50, 053203, 2011.
3. J. Boutet, M. Debourdeau, L. Hervé, A. Laidevant, JM. Dinten, D. Vray, A. Nguyen-Dinh, O. Messineo, P. Georges, N. Grenier, F. Morin, M. Hannad, F. Druon, « A bimodal fluorescence and ultrasound probe to guide prostate biopsy », *IRBM* 32, p.123-125, 2011
4. J. Boutet, L. Herve, M. Debourdeau, L. Guyon, P. Peltie, J.M. Dinten, L. Sarroul, F. Duboeuf, et D. Vray, « Bimodal ultrasound and fluorescence approach for prostate cancer diagnosis », *Journal of Biomedical Optics* 14, p. 064001, 2009
5. J. Boutet, P. Peltié, A. Koenig, et P. Rizo, « Imagerie moléculaire optique. Application au diagnostic médical in vivo », *Instrumentation, Mesure, Métrologie*, vol. 8, p.133-156, 2008
6. A. Laidevant, L. Herve Debourdeau, J. Boutet, N. Grenier, et J. Dinten, « Fluorescence time-resolved imaging system embedded in an ultrasound prostate probe », *Biomed. Opt. Express* 2, p.194-206, 2011
7. A. Koenig, L. Herve, G. Gonon, V. Josserand, M. Berger, J. Dinten, J. Boutet, P. Peltie, J. Coll, et al., « Fluorescence diffuse optical tomography for free-space and multifluorophore studies », *Journal of Biomedical Optics* 15, 016016-8, 2010
8. L. Sancey, S. Dufort, V. Josserand, M. Keramidas, C. Righini, C. Rome, A. Faure, S. Foillard, S. Roux, J. Boutet et al., « Drug development in oncology assisted by noninvasive optical imaging » *International Journal of Pharmaceutics* 379, p.309-316, 2009
9. A. Koenig, L. Herve, V. Josserand, M. Berger, J. Boutet, A. Da Silva, J. Dinten, P. Peltie, J. Coll, et al., « In vivo mice lung tumor follow-up with fluorescence diffuse optical tomography », *Journal of Biomedical Optics* 13, 2008

10. L. Herve, A. Koenig, A. Da Silva, M. Berger, J. Boutet, J. Dinten, P. Peltie, et P. Rizo, « Noncontact fluorescence diffuse optical tomography off heterogeneous media », *Applied Optics* 46, 4896-4906, 2007.
11. A. Laidevant, A. Da Silva, M. Berger, J. Boutet, J. Dinten, et A. Boccara, « Analytical method for localizing a fluorescent inclusion in a turbid medium », *Applied Optics* 46, 2131-2137, 2007
12. L. Hervé, A. Da Silva, A. Koenig, J-M. Dinten, J. Boutet, M. Berger, I. Texier, P. Peltié, P. Rizo, « Fluorescence Tomography Enhanced by Taking into Account the Medium Heterogeneity », *Nuclear Instruments and Methods in Physics Research A*, 571(1-2), p.60-63, 2007
13. A. Koenig, L. Hervé, A. Da Silva, J-M. Dinten, J. Boutet, M. Berger, V. Josserand, I. Texier, P. Peltié, P. Rizo, « Whole body small animal examination with a diffuse optical tomography instrument », *Nuclear Instruments and Methods in Physics Research A*, 571 (1-2) 56–59, 2007.

Actes de congrès à comité de lecture

1. J. Boutet, L. Herve, M. Debourdeau, J-M. Dinten, « Comparison between two time-resolved approaches for prostate cancer diagnosis : high rate imager vs. photon counting system » *Proceedings of SPIE, Photonic Therapeutics and Diagnostics VI*, p.7548B-48, 2010
2. L. Herve, A. Laidevant, L. Lecordier, L. Guyon, M. Debourdeau, J. Boutet, et JM. Dinten, « Localization of fluorescence marked prostate tumor with time-resolved diffuse optical tomography », *Proceedings of SPIE, Multimodal Biomedical Imaging V* 7557, p.75570F-9, San Francisco, CA, USA , 2010
3. J. Boutet, L. Guyon, M. Debourdeau, J.M. Dinten, D. Vray, et P. Rizo, « Advances in bi-modal optical and ultrasound detection of prostate cancer diagnosis », *Proceedings of SPIE, Multimodal Biomedical Imaging IV*, p.71710E, 2009
4. L. Guyon, L. Herve, J. Boutet, M. Debourdeau, N. Djaker, A. da Silva, P. Peltie, J. Dinten, et P. Rizo, « Time-resolved fluorescence tomography in cancer research : backward versus toward geometry », *Proceedings of SPIE*, p.71741X-71741X-11, San Jose, CA, USA, 2009
5. L. Guyon, L. Herve, J. Boutet, M. Debourdeau, N. Djaker, A. da Silva, P. Peltie, J. Dinten, et P. Rizo, « Time-resolved fluorescence tomography in cancer research : backward versus toward geometry », *Proceedings of SPIE*, p. 71741X-71741X-11, San Jose, CA, USA, 2009
6. L. Hervé, A. Koenig, A. Da Silva, M. Berger, J. Boutet, J.M. Dinten, P. Peltié, P. Rizo, « In vivo fluorescence enhanced optical tomography reconstruction of lungs cancer of non immersed small animals », *Proceedings of SPIE, Optical Tomography and Spectroscopy of Tissue VII* 6434, p.643410, 2007.

Brevets

1. Brevet FR1154960 « Module optique pour sonde endoscopique - sonde bimodalité », par J. Boutet, M. Debourdeau, déposé le 07/06/2011
2. Brevet FR1058834 « Protection stérile à guides de lumière pour sonde médicale et procédé de réalisation associé » par J. Boutet, M. Debourdeau, déposé le 27/10/2010
3. Brevet FR n°0957029 « Procédé et dispositif pour l'excitation diffusée en tomographie optique » par L. Guyon, J. Boutet, M. Debourdeau, déposé le 08/10/2009
4. Brevet FR n°0904476 « Fantôme bi-modalité d'organes et procédé de réalisation associé », par J. Boutet, N. Djaker, L. Guyon, F. Duboeuf, D. Friboulet, L. Saroul, D. Vray, brevet déposé le 18/09/2009 .

Participation à des conférences

Communications orales

1. J. Boutet, A. Laidevant, M. Debourdeau, L. Hervé, O. Messiné, D. Vray, J-M. Dinten, « Near-infrared pulsed light to guide prostate biopsy », *SPIE Symposium on Biomedical Optics (BiOS)*, San Francisco, CA, USA, 2011
2. L. Hervé, A. Laidevant, M. Debourdeau, J. Boutet, J-M. Dinten, « Time resolved optical system for an early detection of prostate tumor », *BIOS*, San Francisco, CA, USA, 2011
3. J. Boutet, M. Debourdeau, A. Laidevant, L. Hervé, J-M Dinten, « Comparison between two time-resolved approaches for prostate cancer diagnosis : high rate imager vs. photon counting system », *BIOS*, San Francisco, CA, USA, 2010
4. L. Herve, A. Laidevant, L. Lecordier, L. Guyon, M. Debourdeau, J. Boutet, et J. Dinten, « Localization of fluorescence marked prostate tumor with time- resolved diffuse optical tomography », *BIOS*, San Francisco, CA, USA, 2010
5. J. Boutet, L. Guyon, M. Debourdeau, J.M. Dinten, D. Vray, et P. Rizo, « Advances in bi-modal optical and ultrasound detection of prostate cancer diagnosis », *BIOS*, San Jose, CA, USA, 2009
6. L. Guyon, L. Herve, J. Boutet, M. Debourdeau, N. Djaker, A. da Silva, P. Peltie, J. Dinten, et P. Rizo, « Time-resolved fluorescence tomography in cancer research : backward versus toward geometry », *BIOS*, San Jose, CA, USA, 2009
7. S. Bernhardt, J. Boutet, F. Duboeuf, L. Herve, J-M. Dinten, D. Vray, « Bimodality US/optical imaging : registration and 2D/3D visualization », *IEEE Ultrasonics symposium*, San Diego, CA, USA, 2010
8. J. Boutet, M. Berger, A. Koenig, L. Herve, V. Josserand, A. Da Silva, J.M. Dinten, P. Peltie, et P. Rizo, « Développement d'un tomographe optique de fluorescence pour le petit animal » *OPTDIAG*, Paris, France, 2007

9. J. Boutet, A. Koenig, et J.M. Dinten, « Imagerie moléculaire de fluorescence : du préclinique au clinique », *IMVIE 5*, Mulhouse, France, 2007
10. J. Boutet, M. Berger, A. Koenig, L. Hervé, V. Josserand, A. Da Silva, J.M. Dinten, P. Peltié, P. Rizo, « Développement d'un tomographe optique de fluorescence pour le petit animal », *6ème colloque Optdiag, Diagnostic et Imagerie Optiques en Médecine*, Paris, France, 2007.
11. Koenig A. , Herve L. , DaSilva A. , Dinten J.M.) , Boutet J. , Berger M. , Josserand V. , Coll J.L. « fDOT for in vivo follow-up of tumour development in mice lungs », *European Conference on Biomedical Optics (ECBO)*, Munich, Allemagne, 2007
12. L. Hervé, A. Koenig, A. Da Silva, J.M. Dinten, J. Boutet, M. Berger, Josserand V, Coll J.-L., P. Peltié, P. Rizo, « In vivo fluorescence enhanced optical tomography (fDOT) reconstruction of lungs cancer of non immersed small animals », *BIOS*, San Jose, CA, USA, 2007
13. Koenig A. , Herve L. , DaSilva A. , Dinten J.M. , Boutet J. , Berger M. , Josserand V. (Animage, -) , Coll J.L., Peltie P. , Rizo P., A fDOT instrument for in-vivo mice lung tumors follow-up, *2nd International Conference of the European Society for Molecular Imaging (ESMI)*, Naples , Italie, 2007
14. Jean-Marc Dinten, Philippe Peltié, Anabela da Silva, Jérôme Boutet, Anne Koenig, Lionel Hervé, Michel Berger, Aurélie Laidevant, Philippe Rizo, « Développements d'instrumentation optique pour l'imagerie moléculaire du petit animal », *6ème colloque Optdiag, Diagnostic et Imagerie Optiques en Médecine*, Paris, 2007.

Posters

1. J. Boutet, M. Debourdeau, L. Hervé, D. Vray, N. Grenier, AS. Montcuquet, JL. Coll, JM. Dinten, « Une sonde bi-modalité pour guider les biopsies de la prostate », *7èmes rencontres Techno Santé*, Saclay, France, 2011
2. J. Boutet, M. Debourdeau, A. Laidevant, L. Hervé, F. Duboeuf, D. Vray, N. Grenier, J-M. Dinten, « Une nouvelle sonde endorectale bi-modalité pour une détection précoce du cancer de la prostate », *Journées de la Cancéropole Rhône-Alpes (CLARA)*, Villeurbanne, France, 2010
3. J. Boutet, M. Debourdeau, L. Hervé, A. Laidevant, S. Bernhardt, D. Vray, J-M. Dinten, « Une nouvelle sonde endorectale bi-modalité pour une détection précoce du cancer de la prostate », *6èmes rencontres Technologies pour le Santé*, Grenoble, France, 2010
4. J. Boutet, M. Debourdeau, L. Herve, A. Laidevant, D. Vray, J-M Dinten, « A bimodal ultrasound and optical endorectal probe for prostate cancer diagnosis adapted to the clinical environment », n°0301B Poster Session 4a : Imaging Instrumentation and Methodology, *World Molecular Imaging Congress*, Kyoto, September 11, 2010
5. L. Herve, A. Laidevant, M. Debourdeau, J. Boutet, JM. Dinten, « Fluorescent inclusion localizing precision of a time-resolved diffuse optical prostate probe »,

- n° 0376A Poster Session 2a : Imaging Instrumentation and Methodology, *World Molecular Imaging Congress*, Kyoto, Japon, 2010
6. J. Boutet, L. Lecordier, L. Guyon, L. Herve, M. Debourdeau, et J.M. Dinten, "A general study of optimal geometric parameters for time resolved diffuse optical tomography," Poster Session 1b : Imaging Methodology and Instrumentation, Montreal, Canada, *World Molecular Imaging Congress*, 2009
 7. J. Boutet, M. Debourdeau, A. Laidevant, L. Hervé, J-M. Dinten, « Une approche couplant imagerie ultrasonore et optique pour améliorer le diagnostic du cancer de la prostate », *Journées de la Cancéropole Rhône-Alpes (CLARA)*, Villeurbanne, France, 2008
 8. J. Boutet, L. Saroul, L. Guyon, N. Djaker, M. Debourdeau, J-M. Dinten, P. Peltié, P. Rizo, « Bi-Modality Imaging of an Ultrasound and Optical Tissue-mimicking Phantom for Prostate Cancer Diagnostic », *World Molecular Imaging Congress*, 2008
 9. A. Koenig, L. Hervé, G. Gonon, M. Guidetti, V. Josserand, J. Boutet, M. Berger, J-M. Dinten, P. Peltié, P. Rizo, « Fluid-Free Fluorescence Diffuse Optical Tomography for In vivo Mice Lungs Inspection », New Optical Instrumentation, *World Molecular Imaging Congress*, Nice, France, 2008
 10. L. Guyon, M. Debourdeau, J. Boutet, N. Djaker, L. Hervé, A. da Silva, P. Peltié, J.M. Dinten, P. Rizo, « Non-Invasive Time-Resolved Fluorescence Tomography in Cancer Research : Towards Clinical Applications », New Optical Instrumentation, *World Molecular Imaging Congress*, 2008.

Bibliographie

- [1] S. Prahl. Optical absorption of hemoglobin, <http://omlc.ogi.edu/spectra/hemoglobin>. *Oregon Medical Laser Center*, 1999.
- [2] S. Jacques. Optical absorption of melanin, <http://omlc.ogi.edu/spectra/melanin/>. *Oregon Medical Laser Center*, 1998.
- [3] R. L. P. Van Veen, H. Sterenborg, A. Pifferi, A. Torricelli, and R. Cubeddu. Determination of VIS-NIR absorption coefficients of mammalian fat, with time- and spatially resolved diffuse reflectance and transmission spectroscopy. *Proceedings of Biomedical Topical Meetings*, 2000.
- [4] N. Sato, B. Hagihara, T. Kamada, and H. Abe. A sensitive method for the quantitative estimation of cytochromes a and a₃ in tissues. *Analytical biochemistry*, 74(1) :105, 1976.
- [5] A. Yodh and B. Chance. Spectroscopy and imaging with diffusing light. *Physics Today*, 48(3) :34–41, 1995.
- [6] Joseph R. Lakowicz. *Principles of Fluorescence Spectroscopy*. Springer-Verlag New York Inc., 3rd revised edition edition, August 2006.
- [7] A. Chandrasekhar. *Radiative transfer*. Dover Pubns, 1960.
- [8] P.F. Zweifel K.M. Case. *Linear transport theory*, volume 29. Addison-Wesley Reading, MA, 1967.
- [9] A. Ishimaru. *Wave propagation and scattering in random media*, volume 12. Wiley-IEEE Press, 1999.
- [10] MS Patterson, B Chance, and BC Wilson. Time Resolved Reflectance And Transmittance For the noninvasive measurement of tissue optical-properties. *Applied Optics*, 28(12) :2331–2336, June 1989.
- [11] SR Arridge. Optical tomography in medical imaging. *Inverse Problems*, 15(2) :R41–R93, April 1999.
- [12] S. Chandrasekhar. Stochastic problems in physics and astronomy, 1943. *Rev. Mod. Phys*, 15(1).
- [13] L. R\aaade and B. Westergren. *Beta mathematics handbook*. CRC Press, 1992.
- [14] A Ishimaru. Theory and application of wave-propagation and scattering in random media. *Proceedings of the IEEE*, 65(7) :1030–1061, 1977.

- [15] L. Lerner and A. Bax. Sensitivity-enhanced two-dimensional heteronuclear relayed coherence transfer NMR spectroscopy. *Journal of magnetic resonance*, 69(2) :375–380, 1986.
- [16] Ralph Weissleder and Vasilis Ntziachristos. Shedding light onto live molecular targets. *Nat Med*, 9(1) :123–128, 2003.
- [17] E. Okada and D. T Delpy. Near-infrared light propagation in an adult head model. i. modeling of low-level scattering in the cerebrospinal fluid layer. *Applied Optics*, 42(16) :2906–2914, 2003.
- [18] E. Okada and D. T Delpy. Near-infrared light propagation in an adult head model. II. effect of superficial tissue thickness on the sensitivity of the near-infrared spectroscopy signal. *Applied optics*, 42(16) :2915–2922, 2003.
- [19] A M De Grand and J V Frangioni. An operational near-infrared fluorescence imaging system prototype for large animal surgery. *Technology in Cancer Research & Treatment*, 2(6) :553–562, December 2003. PMID : 14640766.
- [20] Antonio Pifferi, Johannes Swartling, Ekaterine Chikoidze, Alessandro Torricelli, Paola Taroni, Andrea Bassi, Stefan Andersson-Engels, and Rinaldo Cubeddu. Spectroscopic time-resolved diffuse reflectance and transmittance measurements of the female breast at different interfiber distances. *Journal of Biomedical Optics*, 9(6) :1143–1151, November 2004.
- [21] S Kukreti, AE Cerussi, W Tanamai, D Hsiang, BJ Tromberg, and E Gratton. Characterization of metabolic differences between benign and malignant tumors : High-Spectral-Resolution diffuse optical spectroscopy. *Radiology*, 254(1) :277–284, 2010.
- [22] Michael S. Patterson, J. David Moulton, Brian C. Wilson, Klaus W. Berndt, and Joseph R. Lakowicz. Frequency-domain reflectance for the determination of the scattering and absorption properties of tissue. *Applied Optics*, 30(31) :4474–4476, November 1991.
- [23] V Ntziachristos, AG Yodh, M Schnall, and B Chance. Concurrent MRI and diffuse optical tomography of breast after indocyanine green enhancement. *Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America*, 97(6) :2767–2772, March 2000.
- [24] Hak Soo Choi, Wenhao Liu, Fangbing Liu, Khaled Nasr, Preeti Misra, Mouni G. Bawendi, and John V. Frangioni. Design considerations for tumour-targeted nanoparticles. *Nat Nano*, 5(1) :42–47, January 2010.
- [25] Baohong Yuan, NanGuang Chen, and Quing Zhu. Emission and absorption properties of indocyanine green in intralipid solution. *Journal of Biomedical Optics*, 9(3) :497–503, May 2004.
- [26] R Alford, HM Simpson, J Duberman, GC Hill, M Ogawa, C Regino, H Kobayashi, and PL Choyke. Toxicity of organic fluorophores used in molecular imaging : Literature review. *Molecular Imaging*, 8(6) :341–354, December 2009.
- [27] V. Josserand D. Boturyn A. Grichine I. Texier MC. Favrot P. Dumy JL. Coll ZH. Jin, J. Razkin. In vivo noninvasive optical imaging of receptor-mediated RGD

- internalization using self-quenched cy5-labeled RAFT-c(-RGDfK-)(4). *Molecular Imaging*, 6(1) :43–55, February 2007. PMID : 17311764.
- [28] Eiichi Tanaka, Hak Soo Choi, Hirofumi Fujii, Mouni G Bawendi, and John V Frangioni. Image-guided oncologic surgery using invisible light : completed pre-clinical development for sentinel lymph node mapping. *Annals of Surgical Oncology*, 13(12) :1671–1681, December 2006. PMID : 17009138.
 - [29] Kitai Toshiyuki, Inomoto Takuya, Miwa Mitsuharu, and Shikayama Takahiro. Sentinel lymph node biopsy in breast cancer using fluorescence navigation by indocyanine Green-Report of a validation study. *Japanese Journal of Breast Cancer*, 20(3) :250–254, 2005.
 - [30] E. E Graves, J. Ripoll, R. Weissleder, and V. Ntziachristos. A submillimeter resolution fluorescence molecular imaging system for small animal imaging. *Medical Physics*, 30 :901, 2003.
 - [31] C Vinegoni, D Razansky, JL Figueiredo, M Nahrendorf, V Ntziachristos, and R Weissleder. Normalized born ratio for fluorescence optical projection tomography. *Optics Letters*, 34(3) :319–321, February 2009.
 - [32] A Corlu, R Choe, T Durduran, MA Rosen, M Schweiger, SR Arridge, MD Schnall, and AG Yodh. Three-dimensional in vivo fluorescence diffuse optical tomography of breast cancer in humans. *Optics Express*, 15(11) :6696–6716, May 2007.
 - [33] S Keren, O Gheysens, CS Levin, and SS Gambhir. A comparison between a time domain and continuous wave small animal optical imaging system. *IEEE Transactions on Medical Imaging*, 27(1) :58–63, 2008.
 - [34] A. T. N. Kumar, S. B. Raymond, A. K. Dunn, B. J. Bacsikai, and D. A. Boas. A time domain fluorescence tomography system for small animal imaging. *IEEE Transactions on Medical Imaging*, 27(8) :1152–1163, 2008.
 - [35] B Montcel and P Poulet. An instrument for small-animal imaging using time-resolved diffuse and fluorescence optical methods. *Nuclear Instruments & Methods in Physics Research Section*, 569(2) :551–556, December 2006.
 - [36] L. Jiang, J. S. Hodges, J. R. Maze, P. Maurer, J. M. Taylor, D. G. Cory, P. R. Hemmer, R. L. Walsworth, A. Yacoby, A. S. Zibrov, and M. D. Lukin. Repetitive readout of a single electronic spin via quantum logic with nuclear spin ancillae. *Science*, 2009.
 - [37] S.C. Strother, M.E. Casey, and E.J. Hoffman. Measuring PET scanner sensitivity : relating countrates to image signal-to-noise ratios using noise equivalents counts. *Nuclear Science, IEEE Transactions on*, 37(2) :783–788, 1990.
 - [38] CH Li and LHV Wang. Photoacoustic tomography and sensing in biomedicine. *Physics in Medicine and Biology*, 54(19) :R59–R97, August 2009.
 - [39] V. Ntziachristos, C. H Tung, C. Bremer, and R. Weissleder. Fluorescence molecular tomography resolves protease activity in vivo. *Nature Medicine*, 8(7) :757–761, 2002.
 - [40] V. Ntziachristos, E. A Schellenberger, J. Ripoll, D. Yessayan, E. Graves, A. Bogdanov, L. Josephson, and R. Weissleder. Visualization of antitumor treatment by

- means of fluorescence molecular tomography with an annexin V–Cy5. 5 conjugate. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 101(33) :12294, 2004.
- [41] Pre-clinical whole-body fluorescence imaging : Review of instruments, methods and applications. *Photochem. Photobiol. B*.
 - [42] S.L Lindstedt L.R Rhomberg R.P Beliles R.P Brown, M.D Delp. Physiological parameter values for physiologically based pharmacokinetic models. *Toxicology and industrial health*, 13(4) :407, 1997.
 - [43] A.F Chatziioannou G. Alexandrakis, F.R Rannou. Tomographic bioluminescence imaging by use of a combined optical-PET (OPET) system : a computer simulation feasibility study. *Physics in Medicine and Biology*, 50(17) :4225–4241, September 2005.
 - [44] A.F Chatziioannou R.M Leahy B. Dogdas, D. Stout. Digimouse : a 3D whole body mouse atlas from CT and cryosection data. *Physics in Medicine and Biology*, 52(3) :577–587, 2007.
 - [45] A. Koenig, L. Hervé, J. Boutet, M. Berger, J. M. Dinten, A. Da Silva, P. Peltie, and P. Rizo. Fluorescence diffuse optical tomographic system for arbitrary shaped small animals. In *5th IEEE International Symposium on Biomedical Imaging : From Nano to Macro, 2008. ISBI 2008*, page 1593–1596, 2008.
 - [46] Amaan Mazhar, David J Cuccia, Sylvain Gioux, Anthony J Durkin, John V Frangioni, and Bruce J Tromberg. Structured illumination enhances resolution and contrast in thick tissue fluorescence imaging. *Journal of Biomedical Optics*, 15(1) :010506, February 2010. PMID : 20210421.
 - [47] Florian Stuker. Compact hybrid imaging system allows for concurrent FMT and MR imaging in mouse brain. Leiden (Pays-Bas), 2011.
 - [48] R. Weissleder V. Ntziachristos. Experimental three-dimensional fluorescence reconstruction of diffuse media by use of a normalized born approximation. *Optics Letters*, 26(12) :893–895, 2001.
 - [49] A. Da Silva M. Berger J. Boutet J. M. Dinten P. PeltiÃ© P. Rizo L. HervÃ©, A. Koenig. Noncontact fluorescence diffuse optical tomography of heterogeneous media. *Applied Optics*, 46(22) :4896–4906, 2007.
 - [50] David D. Busch and David D. Busch. *Nikon D80 Digital Field Guide*. John Wiley and Sons, 2007.
 - [51] R. Aronson. Boundary conditions for diffusion of light. *Journal of the Optical Society of America A*, 12(11) :2532–2539, 1995.
 - [52] R.Weissleder V.Ntziachristos E.E. Graves, J.Ripoll. A submillimeter resolution fluorescence molecular imaging system for small animal imaging. *Medical Physics*, 30(5) :901–911, 2003.
 - [53] G. Turner R. Weissleder V. Ntziachristos E.E Graves, D. Yessayan. Validation of in vivo fluorochrome concentrations measured using fluorescence molecular tomography. *Journal of Biomedical Optics*, 10 :044019, 2005.

- [54] B. Kuhnast D.M Dupont I. Janssens N. Mackiewicz F. Dollé B. Tavitian F. Ducongé A. Garofalakis, A. Dubois. In vivo validation of free-space fluorescence tomography using nuclear imaging. *Optics Letters*, 35(18) :3024–3026, 2010.
- [55] R. Boisgard F. Dollé B. Tavitian, F. Ducongé. In vivo imaging of oligonucleotidic aptamers. *Meth Mol Biol*, 535 :241, 2009.
- [56] L. Hervé M. Berger JM. Dinten V. Josserand JL. Coll J. Boutet, A. Koenig. Optical tomograph optimized for tumor detection inside highly absorbent organs. *Optical Engineering*, 50 :053203, 2011.
- [57] A. Koenig M. Goutayer J. Arsaut B. Quesson C. Moonen F. Couillaud P.Y Fortin, C. Genevois. In vivo detection of brain tumors in mice using bioluminescence imaging, magnetic resonance imaging and fluorescence molecular tomography. In *P05. New Optical Instrumentation*, Nice, 2008.
- [58] V. Josserand M. Keramidas C. Righini C. Rome A.C Faure S. Foillard S. Roux S. L. Sancey, S. Dufort, D. Boturyn, O. Tillement, A. Koenig, J. Boutet, P. Rizo, P. Dumy, and J.L. Coll. Drug development in oncology assisted by noninvasive optical imaging. *International Journal of Pharmaceutics*, 379(2) :309–316, September 2009.
- [59] J.P Culver L. Zubkov M.J Holboke J. Giammarco B. Chance A.G Yodh T. Durduran, R. Choe. Bulk optical properties of healthy female breast tissue. *Physics in Medicine and Biology*, 47(16) :2847–2861, 2002.
- [60] S van de Ven, A Wiethoff, T Nielsen, B Brendel, M van der Voort, R Nachabe, M Van der Mark, M Van Beek, L Bakker, L Fels, S Elias, P Luijten, and W Mali. A novel fluorescent imaging agent for diffuse optical tomography of the breast : First clinical experience in patients. *Molecular Imaging and Biology*, 12(3) :343–348, June 2010.
- [61] X Intes, J Ripoll, Y Chen, S Nioka, AG Yodh, and B Chance. In vivo continuous-wave optical breast imaging enhanced with indocyanine green. *Medical Physics*, 30(6) :1039–1047, June 2003.
- [62] Stephanie van de Ven, Sjoerd Elias, Andrea Wiethoff, Marjolein van der Voort, Anais Leproux, Tim Nielsen, Bernhard Brendel, Leon Bakker, Martin van der Mark, Willem Mali, and Peter Luijten. Diffuse optical tomography of the breast : Initial validation in benign cysts. *Molecular Imaging and Biology*, 11(2) :64–70, March 2009. PMID : 19030937 PMCID : 2696611.
- [63] T. Nielsen B. Brendel M. van der Voort R. Nachabe M. Van der Mark M. Van Beek L. Bakker L. Fels S. Elias P. Luijten W. Mali S. van de Ven, A. Wiethoff. A novel fluorescent imaging agent for diffuse optical tomography of the breast : First clinical experience in patients. 12(3) :343–348, 2010. PMID : 19798535 PMCID : 2864903.
- [64] C D’Andrea, L Spinelli, D Comelli, G Valentini, and R Cubeddu. Localization and quantification of fluorescent inclusions embedded in a turbid medium. *Physics in Medicine and Biology*, 50(10) :2313–2327, May 2005.

- [65] JC Hebden, H Veenstra, H Dehghani, EMC Hillman, M Schweiger, SR Arridge, and DT Delpy. Three-dimensional time-resolved optical tomography of a conical breast phantom. *Applied Optics*, 40(19) :3278–3287, July 2001.
- [66] D. J. Hawrysz and E. M. Sevick-Muraca. Developments toward diagnostic breast cancer imaging using near-infrared optical measurements and fluorescent contrast agents. *Neoplasia (New York, NY)*, 2(5) :388, 2000.
- [67] J.G Coutard L. Hervé M. Brambilla V. Jossierand J.L Coll J.M Dinten A. Koenig, A. Planat-Chrétien. Potentialities of a new bimodal xray/fluorescence tomograph within a cylindrical geometry for pre-clinical studies. In *Proceedings of SPIE*, volume 7892, page 78920J, 2011.
- [68] A. Garofalakis J. Ogier J. John D.M Dupont K. Gombert B. Tavitian E. Doris F. Ducongé N. Mackiewicz, E. Gravel. Tumor-Targeted polydiacetylene micelles for in vivo imaging and drug delivery. *Small*, 7(19) :2786–2792, October 2011.
- [69] A. Laidevant. Méthodes optiques résolues en temps pour la tomographie de fluorescence dans les milieux diffusants. <http://tel.archives-ouvertes.fr/tel-00122185/en/>, October 2006.
- [70] N. Ducros. Tomographie optique de fluorescence dans les milieux diffusants : apport de l’information temporelle. <http://tel.archives-ouvertes.fr/tel-00473766/en/>, October 2009.
- [71] A. Laidevant, J. Boutet N. Grenier L. Hervé, M. Debourdeau, and JM. Dinten. Fluorescence time-resolved imaging system embedded in an ultrasound prostate probe. *Biomedical Optics Express*, 2(1) :194–206, January 2011.
- [72] P. Poulet H. Zhao Y. Yamada F. Gao J. Li, L. Zhang. Simultaneous fluorescence yield and lifetime tomography from time-resolved transmittances of small-animal-sized phantom. *Applied Optics*, 49(16) :3163–3172, 2010.
- [73] M. Brambilla, L. Spinelli, A. Pifferi, A. Torricelli, and R. Cubeddu. Time-resolved scanning system for double reflectance and transmittance fluorescence imaging of diffusive media. *Review of Scientific Instruments*, 79(1) :013103, 2008.
- [74] V. Y. Soloviev, D.A Cosimo, G. Valentini, R. Cubeddu, and S.R Arridge. Combined reconstruction of fluorescent and optical parameters using time-resolved data. *Applied Optics*, 48(1) :28–36, January 2009.
- [75] S. V. Patwardhan and J. P. Culver. Quantitative diffuse optical tomography for small animals using an ultrafast gated image intensifier. *Journal of Biomedical Optics*, 13(1) :011009, 2008.
- [76] J. Chen, V. Venugopal, F. Lesage, and X. Intes. Time-resolved diffuse optical tomography with patterned-light illumination and detection. *Optics Letters*, 35(13) :2121–2123, July 2010.
- [77] EMC Hillman, JC Hebden, FEW Schmidt, SR Arridge, M Schweiger, H Dehghani, and DT Delpy. Calibration techniques and datatype extraction for time-resolved optical tomography. *Review of Scientific Instruments*, 71(9) :3415–3427, September 2000.

- [78] C.V Zint, W. Uhring, M. Torregrossa, B. Cunin, and P. Poulet. Streak camera : a multidetector for diffuse optical tomography. *Applied Optics*, 42(16) :3313–3320, June 2003.
- [79] J. Wu, Y. Wang, L. Perelman, I. Itzkan, R.R Dasari, and M.S Feld. Time-resolved multichannel imaging of fluorescent objects embedded in turbid media. *Optics Letters*, 20(5) :489–491, March 1995.
- [80] J.C Hebden and K. S Wong. Time-resolved optical tomography. *Applied Optics*, 32(4) :372–380, February 1993.
- [81] D. Contini, A. Torricelli, A. Pifferi, L. Spinelli, F. Paglia, and R. Cubeddu. Multi-channel time-resolved system for functional near infrared spectroscopy. *Optics Express*, 14(12) :5418–5432, June 2006.
- [82] D. Kepshire, N. Mincu, M. Hutchins, J. Gruber, H. Dehghani, J. Hypnarowski, F. Leblond, M. Khayat, and B.W Pogue. A microcomputed tomography guided fluorescence tomography system for small animal molecular imaging. *Review of Scientific Instruments*, 80(4) :043701, 2009.
- [83] I. Nissila, J. C. Hebden, D. Jennions, J. Heino, M. Schweiger, K. Kotilahti, T. Noponen, A. Gibson, S. Jarvenpaa, L. Lipiainen, and T. Katila. Comparison between a time-domain and a frequency-domain system for optical tomography. *Journal of Biomedical Optics*, 11(6) :064015, 2006.
- [84] H. A Sturges. The choice of a class interval. *Journal of the American Statistical Association*, 21(153) :65–66, 1926.
- [85] W. N Venables and B. D Ripley. *Modern applied statistics with S*. Springer verlag, 2002.
- [86] D.W. Scott. On optimal and data-based histograms. *Biometrika*, 66(3) :605 –610, December 1979.
- [87] J. Grimm and H. Hricak. Imaging in urology – looking forward. *Current Opinion in Urology*, 18(1) :61–64, January 2008.
- [88] Y. Pu, W. B. Wang, B. B. Das, S. Achilefu, and R. R. Alfano. Time-resolved fluorescence polarization dynamics and optical imaging of cytochrome c : a prostate cancer receptor-targeted contrast agent. *Applied optics*, 47(13) :2281–2289, 2008.
- [89] X. Zhang, D. Hayes, S. J Smith, S. Friedle, and S. J Lippard. New strategy for quantifying biological zinc by a modified zinpyr fluorescence sensor. *Journal of the American Chemical Society*, 130(47) :15788–15789, 2008.
- [90] M. Debourdeau L. Guyon P. Peltie J.M Dinten L. Saroul F. Duboeuf D. Vray J. Boutet, L. Hervé. Bimodal ultrasound and fluorescence approach for prostate cancer diagnosis. *Journal of Biomedical Optics*, 14 :064001, 2009.
- [91] T.M Busch A. Kachur G.M Griffin T. Vulcan T.C Zhu H.W Wang S.M Hahn A.G. Yodh. M. Solonenko, R. Cheung. In vivo reflectance measurement of optical properties, blood oxygenation and motexafin lutetium uptake in canine large bowels, kidneys and prostates. *Physics in Medicine and Biology*, 47(6) :857–874, 2002.

- [92] F. P Navarro, M. Berger, M. Goutayer, S. Guillermet, V. Josserand, P. Rizo, F. Vinet, and I. Texier. A novel indocyanine green nanoparticle probe for non invasive fluorescence imaging in vivo. In *Proceedings of SPIE*, volume 7190, page 71900L, 2009.
- [93] HP.Brecht R. Su A. Conjusteau M. Fronheiser B. A. Bell M. Motamedi A. A. Oraevsky M. A. Yaseen, S. A. Ermilov. Optoacoustic imaging of the prostate : development toward image-guided biopsy. *Journal of Biomedical Optics*, 15(2) :021310–8, March 2010.
- [94] Greg Hollows and Stuart Singer. Matching lenses and sensors - vision systems design. *Vision Systems Design*, 14(3), March 2009.
- [95] JC Mullikin, LJ Vanvliet, H Netten, FR Boddecke, G Vanderfeltz, and IT Young. Methos for CCD camera characterization. *Image Acquisition And Scientific Imaging Systems*, 2173 :73–84, 1994.

Localisation d'inclusions fluorescentes dans les milieux diffusants à l'aide de techniques laser.

Application au diagnostic médical *in vivo*.

Résumé

La tomographie de fluorescence est une méthode d'imagerie préclinique et clinique permettant de localiser des traceurs fluorescents préalablement injectés ou naturellement présents dans un organisme vivant. Ce travail de thèse a consisté, dans un premier temps, à définir l'architecture et les conditions d'utilisation optimales d'un tomographe de fluorescence continu appliqué à l'observation de tissus de faible épaisseur. On s'est en particulier attaché à traiter le problème de l'observation de tissus hétérogènes et d'organes fortement absorbants. Dans un deuxième temps, pour observer des tissus de plus grande épaisseur, nous avons montré l'apport de la mesure du temps de vol moyen des photons pour améliorer la localisation d'inclusions fluorescentes. Les performances de deux types de systèmes capables de réaliser ce type de mesure ont été comparées et nous avons proposé un protocole permettant d'en optimiser les principaux paramètres. Notre procédé a été appliqué à la problématique du guidage de biopsies prostatiques. Il pourra aussi être utilisé pour visualiser d'autres pathologies moyennant une simple adaptation.

Localizing fluorescent inclusion in diffusive media
by means of laser techniques.

Application to *in vivo* medical diagnosis.

Abstract

Fluorescence tomography is a preclinical and clinical imaging method which aims to localize fluorescent probes injected into a living organism. In this thesis work, we firstly defined the optimal design and parameters of a continuous wave fluorescent tomograph applied to thin tissue observation. We handled the problem of observing heterogeneous and highly absorbing organs. Secondly, we showed the advantage of time of flight measurement for inclusion detection through thicker tissues. The detection performances of two types of system capable of these measurements were compared and we proposed a protocol to optimize their main parameters. This process was applied to the problematic of prostatic biopsy guiding. It would also be used to detect and localize other pathologies by means of a simple adaptation.